第 41 回薬剤耐性菌研究会

プログラム·抄録集

平成 24 年 10 月 25 日（木）26 日（金）

岐阜県下呂市　望川館　コンベンションホール

第 41 回薬剤耐性菌研究会

会　期：平成 24 年 10 月 25 日（木）13：00 ～
平成 24 年 10 月 26 日（金）12：20

会　場：望川館　コンベンションホール
〒509-2207 岐阜県下呂市湯之島 190-1
TEL: 0576-25-2048　FAX: 0576-25-2390
http://www.bosenkan.co.jp/index.htm

世話人：荒川　宣親　（名古屋大学大学院医学系研究科）
同　：池　康嘉　（群馬大学大学院医学系研究科）
同　：山本　友子　（千葉大学大学院薬学研究院）

研究会事務局　連絡先：群馬大学大学院医学系研究科･薬剤耐性菌研究施設
代表　：富田　治芳
TEL: 027-220-7992　FAX: 027-220-7996

第 41 回薬剤耐性菌研究会

会場案内図（望川館）

・ JR 下呂駅より徒歩 20 分

・ JR 下呂駅より会場まで無料シャトルバスを 2 便運行いたします。

　シャトルバス出発時刻　①12：30　②12：45

・ お帰りの際も無料シャトルバスをご利用頂けます。

・ 車で来られる際には、望川館まで直接お越し下さい。

ご　案　内

1.　参加受付

受付は 10 月 25 日（木）　12 : 00 より望川館 1 F ロビーにて行います。

14 : 00 以降の受付につきましては、コンベンションホール前にて行いますのでご注意下さい。

2.　宿泊／参加費

17,000 円（内訳 : 年会費 1,000 円、研究会参加費 6,000 円、宿泊費 10,000 円）

3.　口演発表

･一般演題の口演時間は 12 分、質疑応答 3 分です。

･1 演題あたりスライド 12 枚以内でお願いします。

･発表はマイクロソフトパワーポイントでお願いします。

･USB メモリ等で発表データをお持ちの方は、発表用 PC（windows7, PowerPoint2010)を使用して頂くこともできます。Macintosh をご利用の方はご自身の PC 本体をご持参下さい。

･発表に際し、COI やスポンサーシップ等につきましては、先生方ご自身で対応願います。

4.　ICD 教育講演参加受講証明書について

本研究会は ICD 協議会の教育講演会として認定されており、ICD 認定更新点数 2 点を取得できます。参加受講証明書の必要な方は受付時にお申し出下さい。

第 41 回薬剤耐性菌研究会プログラム

平成 24 年 10 月 25 日（木）

(13:00~18:10)

12:55-13:00

開会の挨拶　荒川　宜親（名古屋大学）

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

耐性機構

13:00~14:15　座長：木村　幸司（名古屋大学）

ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌とペニシリン感受性 B 群連鎖球菌の遺伝的背景の比較検討

○山田 涼子[1]、木村 幸司[1,2]、長野 則之[2,3]、長野 由紀子[2]、鈴木 里和[2]、和知野 純一[1,2]、岡本 陽[1]、山田 景子[1]、柴山 恵吾[2]、荒川 宜親[1,2]

（[1]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学、[2]国立感染症研究所 細菌第二部、[3]船橋市立医療センター）

セフチブテンディスクで阻止帯形成が認められないペニシリン感性 B 群レンサ球菌の分子学的解析

○長野 則之[1,2]、 長野 由紀子[2]、 外山 雅美[1,2]、 木村 幸司[3]、 柴山 恵吾[2]、荒川 宜親[3]

（[1]船橋市立医療センター 微生物検査室、[2]国立感染症研究所 細菌第二部、[3]名古屋大学大学院医学系研究科）

座長：富田　治芳（群馬大学）

肺炎球菌のリボソームメチル化とマクロライド・ケトライド耐性

高屋 明子、庄司 竜麻、佐藤 慶治、○山本 友子

（千葉大学大学院薬学研究院 微生物薬品化学研究室）

産業医科大学病院におけるバンコマイシンの MIC 値が低い *vanB* 遺伝子保有 *Enterococcus faecium* 再検出に関与する因子の検討

○鈴木 克典[1]、松本 哲朗[1,2]

（[1]産業医科大学病院 感染制御部、[2]産業医科大学 医学部 泌尿器科学）

VanN 型 VRE の解析

○野村 隆浩[1]、谷本 弘一[2]、荒川 宜親[3]、 柴山 恵吾[4]、 池 康嘉[1]、 富田 治芳[1,2]
（[1]群馬大学大学院医学系研究科 細菌学、[2]群馬大学大学院医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設、[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学、[4]国立感染症研究所 細菌第二部）

病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構

○田辺公一、名木　稔、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮崎義継
（国立感染症研究所　生物活性物質部）

～～～～コーヒーブレイク 14:15~14:30～～～～～～

耐性菌の疫学、サーベイランス、感染制御

14:30~15:00　　　　　　　　　　座長：松井　真理（国立感染症研究所）

大学病院におけるメロペネムおよびドリペネムの使用量とメロペネムの緑膿菌に対する感受性との関連性

○宮脇 康至[1,2]、関 雅文[1]、薮野 佳小里[2]、三輪 芳弘[2]、浅利 誠志[1]、朝野 和典[1]
（[1]大阪大学医学部附属病院 感染制御部、[2]大阪大学医学部附属病院 薬剤部）

医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の解析

○多田 達哉、秋山 徹、島田 佳世、切替 照雄
（国立国際医療研究センター研究所　感染症制御研究部）

耐性機構

15:00~16:00　　　　　　　　　　　　　座長：山本　友子（千葉大学）

IPM に感受性（中間耐性）を示すメタロ-β-ラクタマーゼ産生 Enterobacteriacea の出現

鹿山鎮男[1,2]、繁本憲文[1,2,3]、桑原隆一[1,2,4]、小野寺一[1,5]、横崎典哉[1,6]、大毛宏喜[1,7]、○菅井基行[1,2]
（[1]広島大学 院内感染症プロジェクト研究センター、[2]広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科　細菌学、[3]広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科 外科学、[4]広

島鉄道病院検査室、[5]広島大学病院診療支援部感染症検査部、[6]広島大学病検査部、[7]広島大学病感染症科）

阪神地区における 91 淋菌臨床株の *gyrA*, *parC* のアミノ酸変異とキノロン系抗菌薬への薬剤感受性の検討
○重村 克巳、田中 一志、白川 利朗、三宅 秀明、荒川 創一、藤澤 正人
（神戸大学大学院医学系研究科 腎泌尿器科学分野）

座長：川村　久美子（名古屋大学）
海外輸入事例及び国内事例に由来する多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の解析
○丸山 悠太[1]、外山 雅美[2,3]、松井 真理[3]、長野 則之[2,3]、長野 由紀子[3]、柴山 恵吾[3]、荒川 宜親[4]
（[1]船橋市立医療センター 小児科（初期臨床研修医）、[2]船橋市立医療センター 微生物検査室、[3]国立感染症研究所 細菌第二部、[4]名古屋大学大学院医学系研究科）

健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド伝達性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA* の広まり
○佐藤 夏巳[1]、後藤 謙介[1]、村 竜輝[2]、善野 孝之[2]、中根 邦彦[3]、川村 久美子[1]、荒川 宜親[3]
（[1]名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻 病態解析学分野、[2]名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻、[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学）

検出
16:00~16:30　座長：谷本　弘一（群馬大学）
マイクロデバイスを用いた簡易迅速感受性測定法
○松本 佳巳[1]、榊原 昇一[1]、飯野 亮太[2]、野地 博行[2]、西野 邦彦[1]、山口 明人[1]
（[1]大阪大学産業科学研究所、[2]東京大学大学院・工学系）

緑膿菌の鉄獲得シグナル伝達系を標的としたスクリーニング系の開発

佐藤 一樹、秋葉 敬斉、安藤 太助、磯貝 恵美子、○米山 裕
（東北大学大学院 農学研究科）

～～～～コーヒーブレイク 16:30~16:45～～～～～～

検出

16:45~17:15　　　　　　　　　座長：長野　則之（船橋市立医療センター）

免疫蛍光抗体法によるβ-lactamase 産生菌迅速検出法の構築

○横山 覚[1]、川村 久美子[1]、黒崎 博雅[2]、荒川 宜親[3]
([1]名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻 病態解析学分野、[2]熊本大学大学院生命科学研究部 構造機能物理化学分野、[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学)

パイロシークエンスを用いた *Acinetobacter baumannii* 流行株の迅速検出方法の検討

○松井 真理[1]、鈴木 里和[1]、鈴木 仁人[1]、柴山 恵吾[1]、荒川 宜親[1,2]
（[1]国立感染症研究所 細菌第二部　　[2]名古屋大学大学院 医学系研究科）

～～～～トイレ休憩 17:15~17:20～～～～～～

特別講演

発表 40 分、質疑 10 分

17:20~18:10　　　　　　　　　座長：荒川　宜親（名古屋大学）

異物排出輸送の構造的基礎

山口 明人

（大阪大学産業科学研究所 生体情報制御学研究分野　教授）

2日目　　平成24年10月26日（金）

8:00~12:20

一般演題：発表12分、討論3分

構造と阻害剤

8:00~8:30　　座長：和知野　純一（名古屋大学）

メタロ－β－ラクタマーゼ活性阻害におけるメルカプトカルボン酸の至適炭素鎖長の決定と加水分解反応速度に及ぼすアニオンの影響

○黒崎 博雅[1]、山口 佳宏[2]、荒川 宜親[3]
（[1]熊本大学大学院 生命科学研究部、[2]熊本大学 環境安全センター、[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学）

新型メタロ-β-ラクタマーゼSMB-1の構造機能解析

○和知野 純一[1]、山口 佳宏[2]、森茂太郎[3]、黒崎 博雅[4]、柴山 恵吾[3]、荒川 宜親[1]
（[1]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学、[2]熊本大学環境安全センター、[3]国立感染症研究所 細菌第二部、[4]熊本大学大学院 生命科学研究部）

メタロβ-ラクタマーゼ（MBL）産生緑膿菌による人工呼吸器関連肺炎（VAP）モデルにおけるMBL阻害薬ME1071の有効性

○山田 康一[1,2]、柳原 克紀[1,2]、賀来 敬仁[1]、原田 陽介[1,2]、右山 洋平[1,2]、長岡 健太郎[1,2]、森永 芳智[2]、泉川 公一[2]、掛屋 弘[2]、山本 善裕[2]、河野 茂[2]
（[1]長崎大学病院 検査部、[2]長崎大学病院 第二内科）

耐性機構

8:30~9:45

緑膿菌のカルバペネム耐性に関与する新規遺伝子の解析

○谷本 弘一[1]、富田 治芳[1,2]
（[1]群馬大学大学院医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設、[2]群馬大学大学院医学系研究科 細菌学）

緑膿菌多剤耐性株における *mexS-mexT* 遺伝子による耐性制御

○間世田 英明[1]、上手 麻希[1]、中江 太治[2]、市瀬 裕樹[1]、白井 昭博[1]、大政 健史[1]
（[1]徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部、[2]北里大学研究所 抗感染症薬研究センター）

座長：鈴木　匡弘（愛知県衛生研究所）

犬由来大腸菌におけるフルオロキノロン耐性およびセファロスポリン耐性の関連

○佐藤 豊孝[1]、横田 伸一[2]、大久保 寅彦[1]、臼井 優[1]、藤井 暢弘[2]、田村 豊[1]
（[1]酪農学園大学・獣医・食品、[2]札幌医科大学・医・微生物）

薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割

○臼井 優、岩佐 友寛、佐藤 豊孝、大久保 寅彦、田村 豊
（酪農学園大学　獣医学群獣医学類　食品衛生学ユニット）

ヒトの病原菌由来 R プラスミドと高い相同性を有する魚類病原菌 *Aeromonas hydrophila* の多剤耐性 R プラスミド

○青木 宙[1,2]、Chris S. del Castillo[2]、引間 順一[2]、Ho-Bin Jang[2]、竹山 春子[3]、Tae-Sung Jung[2]
（[1]早稲田大学 先端科学・健康医療融合研究機構、[2]Aquatic Biotechnology Center of WCU Project, Gyeongsang National University、[3]早稲田大学理工学術院 先端生命医科学センター）

～～～～コーヒーブレイク 9:45~10:00～～～～～～

薬剤感受性、サーベイランス

10:00~11:30　　座長：鈴木　里和（感染研）

小児 3 次医療機関の入院患者における便中 ESBL 産生菌の保有率

○南 希成[1,2]、川上 由行[5]、庄司 康寛[1,2]、笠井 正志[1,2]、小木曽 嘉文[2]、中村 友彦[2]、齋藤 義信[3]、葛本 佳以[3]、久保田 紀子[3]、湯本 佳代子[3]、石井 絹子[2,4]
（長野県立こども病院　[1]総合小児科、[2]感染制御室、[3]臨床検査科、[4]看護部、[5]

信州大学大学院　医学系研究科 保健学専攻 医療生命科学分野）

当院における抗菌薬適正使用推進の取り組みと薬剤耐性菌検出状況

〇渡邉 珠代[1]、丹羽 隆[1,2]、太田 浩敏[1,3]、鈴木 智之[1]、土屋 麻由美[1]、伊藤 善規[2]、清島 満[3]、村上 啓雄[1]、藤本 修平[4]
（[1]岐阜大学医学部附属病院 生体支援センター、[2]岐阜大学医学部附属病院 薬剤部、[3]岐阜大学医学部附属病院 検査部、[4]東海大学医学部基礎医学系 生体防御学）

座長：長沢　光章（東北大学病院）

JANIS データよりみた CLSI ブレークポイント変更に伴う *P.aeruginosa* および *E. coli* における薬剤感受性率への影響

〇堀 光広（岡崎市民病院）、長沢 光章（東北大学病院 診療技術部）、郡 美夫（東京医学技術専門学校）、犬塚 和久（愛知県厚生連医療事業部）、佐藤 智明（山形大学医学部附属病院）、静野 健一（千葉市立海浜病院）、柳沢 英二（(株)ミロクメディカルラボラトリー）、荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学）

集計方法別の薬剤感受性率の比較
～*P. aeruginosa* の感受性成績～

〇佐藤 智明（山形大学医学部附属病院）、長沢 光章（東北大学病院 診療技術部）、郡 美夫（東京医学技術専門学校）、犬塚 和久（愛知県厚生連医療事業部）、堀 光広（岡崎市民病院）、静野 健一（千葉市立海浜病院）、柳沢 英二（(株)ミロクメディカルラボラトリー）、荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学）

座長：山田　景子（名古屋大学）

日本の同一地域に位置する病院から分離されたメチシリン耐性黄色 ブドウ球菌の流行調査

〇伊藤 歩[1]、中南 秀将[1]、池田 雅司[1]、内海 健太[2]、丸山 弘[3]、坂本 春生[4]、高里 良男[5]、西成田 進[6]、野口 雅久[1]
（[1]東京薬科大学・薬学部・病原微生物学教室、[2]東京医科大学・八王子医療センター・呼吸器内科、[3]日本医科大学・外科、[4]東海大学医学部付属病院・口腔外科、

[5]国立病院機構災害医療センター・脳神経外科、[6]公立阿伎留医療センター・感染症科）

MRSA POT 解析からみた MRSA の抗菌剤に対する感受性の検討
- 院内感染型と市中感染型 -

○平山 幸雄[1]、村川 智美[1]、吉多 仁子[2]、所　知都子[2]、北橋 由紀子[2]、田澤 友美[2]、松本 智成[1]
（[1]大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部、[2]大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター検査科）

黄色ブドウ球菌の抗 MRSA 薬の感受性調査

○山田景子[1]、白井義憲[1]、金万春[1]、岡本陽[2]、和知野純一[1]、木村幸司[1]、荒川宜親[1]
（[1]名大院・医・分子病原細菌学、[2]愛教大・教育・養護教育）

検査、疫学方法　　　　　　　　　　　　　　座長：藤本　修平（東海大学）
11:30~12:15

新しい抗酸菌集菌用試薬 TB-beads 法の検討

○吉多 仁子[1]、所 知都子[1]、北橋 由紀子[1]、田澤 友美[1]、小野原 健一[1]、森下 裕[1]、平山 幸雄[2]、松本 智成[2]
（[1]大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床検査科、[2]大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部）

緑膿菌のデジタル分子疫学法の開発

○鈴木 匡弘[1]、山田 和弘[1]、細羽 恵理子[2]、長尾 美紀[3]、馬場 尚志[4]、飯沼 由嗣[4]
（[1]愛知県衛生研究所 細菌研究室、[2]国立病院機構 名古屋医療センター、[3]京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学、[4]金沢医科大学 臨床感染症学）

Σ-alert matrix（菌の異常集積警告スコア累積カラーマトリクス）

○藤本 修平[1]、村上 啓雄[2]、荒川 宜親[3]、柴山 恵吾[4]
（[1]東海大学医学部 基礎医学系生体防御学、[2]岐阜大学大学院医学系研究科 地域

医療医学センター、[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学、[4]国立感染症研究所 細菌第二部）

12：15-12：20
閉会の挨拶

ペニシリン低感受性B群連鎖球菌とペニシリン感受性B群連鎖球菌の遺伝的背景の比較検討

○山田　涼子[1)]　木村　幸司[1, 2)]　長野　則之[3)]　長野由起子[2)]　鈴木里和[2)]　和知野純一[1, 2)]　岡本　陽[1)]　山田　景子[1)]　柴山　恵吾[2)]　荒川　宜親[1,2)]

名古屋大学医学部・分子病原細菌学／耐性菌制御学[1)], 国立感染症研究所・細菌第二部[2)], 船橋市立医療センター[3)]

［背景と目的］

B 群連鎖球菌(Group B streptococcus, GBS)は、新生児の敗血症や髄膜炎の主要な原因菌である。GBS はβ-ラクタム系抗菌薬に感受性があるとされてきたが、近年木村らが世界に先駆けてペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌（PRGBS）を報告し、次いで米国やカナダでもその存在が報告されている。過去に行われた Multilocus sequence typing (MLST) 解析の結果、日本で分離された PRGBS は少なくとも２つの遺伝的に異なるグループ (ST1 group と ST23 group) から発生していることが分かったが、これらは米国で分離された 4 株の PRGBS (ST19) とは遺伝的に離れたものであった。日本の PRGBS28 株のうち大部分が ST1 group に属し(n=23)、ST458 (n=11) は PRGBS において初めて確認された。

このように日本の PRGBS の ST には偏りが見られるが、対照となるペニシリン感受性 GBS (Penicillin　susceptible GBS, PSGBS) の ST についての情報が現在少ないため、その意義を十分に理解することは難しい。よって本研究は、日本で分離された PSGBS の ST の分布を調べ、PRGBS のそれと比較することで、PRGBS の発生過程を推察する目的で行った。

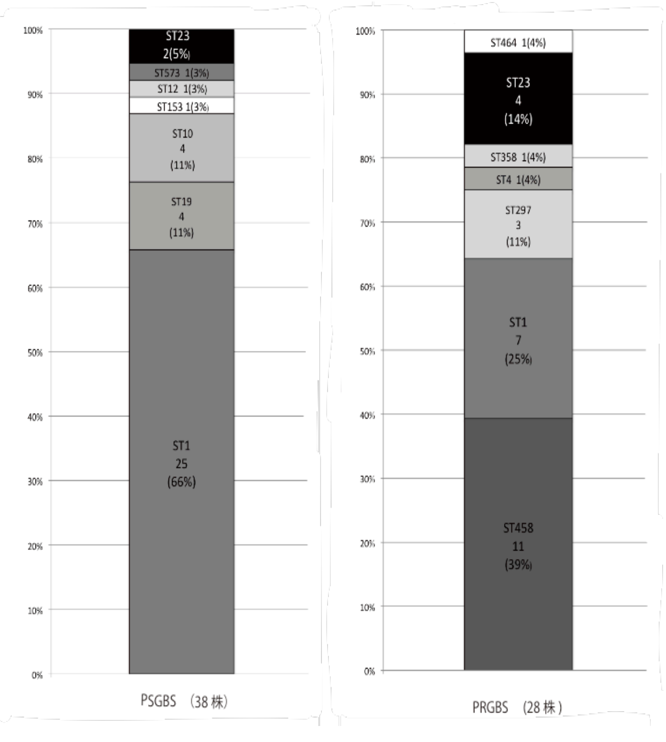
［方法］

2001～2008 年に、日本で採取された喀痰由来の PSGBS (PCG MIC,0.03~0.06ug/ml) 38 株を使用した。MLST 解析を行い、各株の 7 つのハウスキーピング遺伝子(adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK, tkt) の allele を決定し、allele profile の組み合わせから ST を決定した。

［結果］

決定した PSGBS38 株の ST は、以下のようになった。

ST	1	19	10	153	12	573	23
株数	25	4	4	1	1	1	2
比率(%)	66	11	11	3	3	3	5



［考察］

今回の PSGBS38 株では、PRGBS でも確認された ST1 や ST23 が見られ、また ST1 は全体の 66%を占めた。よって PRGBS の ST 分布は、PSGBS とおおむね一致しているといえる。しかし eBURST によって ST 間の遺伝的関係を調べてみると、PSGBS では ST10 や ST19 など、ST1 と遺伝的に離れた ST も見つかったのに対し、PRGBS の ST1 group は ST1 と、ST1 に近い allele profile を持つ ST のみで構成されていたことから、PRGBS に移行しやすいのは、ST1 とその近傍の ST であるということが示唆される。

ST1 や ST23 とは対照的に、PRGBS で初めて発見された ST458 は、今回の PSGBS では検出されなかった。よって ST458 が、PRGBS に特異的な ST である可能性がある。ST458 と ST1 は tkt の allele の違いによって区別されるが、この tkt はゲノム上では、GBS のペニシリン低感受性獲得の原因遺伝子である pbp2X の近傍に位置している。pbp2X の変異が何らかの形で tkt の変異とリンクしており、ST1 PSGBS から ST458 PRGBS が発生している可能性も考えられる。

また、ST1 PSGBS や ST1 PRGBS では serotypeVI 株が 50%程度を占めた。しかし ST458 PRGBS においては、80%以上の株が serotypeVI であった。よって ST458 PRGBS の serotypeVI 株は、ST1 PSGBS の serotypeVI 株から発生した可能性も考えられる。

今回の実験で、日本の PRGBS と PSGBS の ST には異なる傾向があることが分かった。より正確な比較をするためには、さらに多くの呼吸器系や他の部位由来の PSGBS の ST を調べる必要がある。

セフチブテンディスクで阻止帯形成が認められないペニシリン感性 B 群レンサ球菌の分子学的解析

○長野則之[1,2]，長野由紀子[2]，外山雅美[1,2]，木村幸司[3]，柴山恵吾[2]，荒川宜親[3]
[1]船橋市立医療センター 微生物検査室
[2] 国立感染症研究所　細菌第二部
[3]名古屋大学大学院　医学系研究科

【目的】セフチブテン(CTB)ディスクで阻止帯を形成しないB群レンサ球菌(GBS)の多くはペニシリン低感受性B群レンサ球菌(PRGBS)であるが、時にペニシリン感性株(PSGBS)に遭遇する。本報ではこのCTBで阻止帯を形成しないGBS(CTB^RPSGBS) の分子学的特性について報告する。
【材料と方法】2011 年 5 月から 2012 年 1 月の間に検出された CTB^RPSGBS6 株(いづれも血清型 Ib)及び同一施設で同時期に血清型に基づき選択された PRGBS2 株と PSGBS1 株の計 9 株を解析対象とした(なお、同一患者の同一材料から 4 日の間隔で分離された CTB^RPSGBS と PRGBS が含まれる)。 PBP2X、2B、1A 構造遺伝子の塩基配列を決定した。さらにこれらの連結配列の系統解析を行った。MLST 解析には 7 種のハウスキーピング遺伝子 *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkt* を用いた。また、SmaI 消化 DNA の PFGE 解析を行った。
【結果及び考察】CCLのMICはPSGBS(1-2 μg/ml)に比べCTB^RPSGBSとPRGBSでは上昇(8–16 μg/ml)が認められ、CZXのMICはPSGBS(0.064-0.19 μg/ml)に比べPRGBSでは上昇し(>32 μg/ml)、CTB^RPSGBSではわずかな上昇(0.75–1.5 μg/ml)であった。CTB^RPSGBSはPCG及びABPCに感性であった。CTB^RPSGBS6株はPBP 2XにT394A、PBP 2BにT567Iの置換を共有しており、さらにPBP 2XにG429Sを有する3株、PBP 1AにT145Aを有する3株の二つのグループに分かれていた。一方PRGBS2株はPBP 2XにA400V、V405A、Q557E、PBP 2BにT567Iを共有していたが、このPBP 2Bの置換はCTB^RPSGBSとも共通していた。PFGE解析の結果CTB^RPSGBSのパターンは株間で異なっており、さらにはPRGBSのパターンとも異なっていた。系統解析によりCTB^RPSGBS6株は一つのクレードを形成し、さらにPRGBSで形成されるクレードの姉妹群として位置付けられたが、これらの株は全てMLSTでST1に属していた。
　EUCASTでは溶血性レンサ球菌でPCG感性の場合、β-ラクタム系薬に感性と推定されると言及している。CTBやCCLはGBS感染症の治療薬ではないが、新しく認識されたCTB^RPSGBSクローンの存在は、PCG感性のGBSにおいてもPBPのアミノ酸置換や置換位によっては他のβ-ラクタム系薬のMICを推定することが困難となる可能性を示している。このことはPBPの置換とβ-ラクタム系薬の感受性プロファイルとの関連性を理解するうえで重要であろう。

肺炎球菌のリボソームメチル化とマクロライド･ケトライド耐性

高屋明子，庄司竜麻，佐藤慶治，○山本友子
千葉大学　大学院薬学研究院　微生物薬品化学研究室

細菌の rRNA は、転写後に種々の特異的酵素によって修飾をうける。この修飾はリボソームの翻訳装置としての機能に大きく影響すると考えられるが、その役割はいまだ充分には理解されていない。一方で、薬剤耐性をもたらす rRNA の修飾が多く報告されてきた。例えば、外来性遺伝子 *erm* がコードする methyltransferase (Erm)による 23S　rRNA domain V A2058 のメチル化は、グラム陽性細菌にマクロライド耐性をもたらす。Telithromycin（TEL）は、Erm により A2058 がメチル化されたマクロライド高度耐性菌（特に肺炎球菌）にも有効なケトライド系抗菌薬である。その強い抗菌活性はマクロライドの結合部位である A2058 のみならず 23S　rRNA domain II の A752 にも結合力を有するためと考えられている。

我々は、TEL 耐性肺炎球菌の次世代シークエンス解析並びに遺伝生化学的解析を行った結果、23S　rRNA domain II の G748 をメチル化する methyltransferase をコードする内在性遺伝子 *rlmA^II^* の変異により肺炎球菌が TEL に耐性化することを見出した。元来野生型（TEL 感受性）肺炎球菌では、G748 の N1 位が *rlmA^II^* 酵素によってメチル化されているのに対し、TEL 耐性菌では *rlmA^II^* の欠失あるいは変異によりこの N1 位はフリーとなっていた。これらの結果をもとに、rRNA メチル化と肺炎球菌のマクロライド･ケトライド耐性との関連を考察する。

産業医科大学病院におけるバンコマイシンのMIC 値が低い*vanB* 遺伝子保有*Enterococcus faecium*再検出に関与する因子の検討

○鈴木克典[1)]　松本哲朗[1) 2)]

[1)] 産業医科大学病院　感染制御部

[2)] 産業医科大学　医学部　泌尿器科学

【背景】当院でVREが分離された場合、患者は個室管理、標準予防策および接触感染対策を徹底している。必要に応じて同室者、病棟、全病院で監視培養を行っている。隔離解除の条件は、感染がなく、抗菌薬非投与下でVREが同定された検査検体と同じ検査検体から３回陰性を確認した場合としている。*Enterococcus faecium*は腸内細菌で完全な陰性化は困難である。仮に３回陰性の場合でもそれ以降検査を行った場合でしばしば陽性化していることを経験する。VREの保菌・感染を指摘された既往がある患者の場合には、VREが陰性化していても再入院する際に、当該患者が抗菌薬を使用される場合には個室管理としている。また、北九州地域では、*van B*遺伝子を保有しているが、バンコマイシンのMIC値が4μg/ml、8μg/mlと低値を示す*Enterococcus faecium*が存在し、医療機関のなかで広がっている。しかし、このようなVRE保菌既往患者の再入院時の感染管理については未だ確立されたものはない。

【対象および方法】2007年から2011年の4年間に当院で検査検体およびスクリーニングでVRE保菌を確認した患者のうち、フォローアップの検査で陰性化が確認され、その後当院に再入院した25名を対象としてVRE再検出の要因を検討した。

【結果】VREを一旦保菌し、その後3回陰性化が確認された患者のうち、当院へ再入院したのは25名であった。再入院時に抗菌薬投与がなされていなかった患者は8名であり、抗菌薬投与がなされていた患者が17名であった。VREが再検出された患者は4名だったが、全例に抗菌薬が使用されていた。しかし、抗菌薬が投与されていてもVREが検出されなかった患者が13名いた。

【考察】VRE は、感染対策上、その管理が非常に難渋する薬剤耐性菌の一つである。今回の検討では、VRE の再検出は抗菌薬の選択圧だけではなく、腹部の侵襲的な検査・処置行った場合にも VRE は再検出される可能性があった。これは、宿主側の全身状態など要因がある可能性も示唆された。

VanN 型 VRE の解析

〇野村隆浩[1], 谷本弘一[2], 荒川宜親[3], 柴山恵吾[4], 池康嘉[1], 富田治芳[1,2]

[1]群馬大学大学院医学系研究科 細菌学
[2]群馬大学大学院医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設
[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学
[4]国立感染症研究所　細菌第二部

これまでに、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の耐性遺伝子オペロンは VanA、VanB、VanC、VanD、VanE、VanG、VanL、VanM、VanN 型の 9 種類の報告がある。このうち VanN 型 VRE 株はフランスで臨床分離され 2011 年 10 月に報告された新規の型で 1 例のみである。今回、我々は国産鶏肉から VanN 型と同一の耐性遺伝子を持つ VRE 株を分離したので報告する。

【材料・方法】2011 年 2 月から 5 月までの期間に収集した国産の鶏肉 90 検体と豚肉 45 検体の拭き取りスワブと外国産の鶏肉 85 検体と豚肉 102 検体のミンチ肉計 322 検体を用いた。VRE の検出、PCR、パルスフィールド電気泳動(PFGE)、サザンハイブリダイゼーション及び接合伝達実験は既報にしたがった。遺伝子発現はリアルタイム PCR 法を用いた。

【結果】322 検体のうち 129 検体から VanC1 型 349 株 VanC2 型 17 株型別不明 5 株の計を 371 株の VRE を分離した。これらは全て低度バンコマイシン(VCM)耐性(MIC6～12μg/ml)を示した。型別不明の 5 株は同一検体から分離され全て *E. faecium* 菌であり PFGE 解析の結果全て同一であった。その代表株を用い耐性遺伝子の詳細な解析を行った。複数の D-Ala peptide ligase 遺伝子を非特異的に PCR で増幅するプライマーを設計し、これを用い増幅された PCR 産物を解析し ligase 遺伝子内部の塩基配列を決定した。得られた配列を基にプライマーを順次設計し Inverse-PCR 法を利用して耐性遺伝子オペロン全体の塩基配列を決定した。得られた塩基配列は報告された VanN 型遺伝子群とほぼ同一で 1 塩基の挿入と 1 塩基の置換の違いのみ存在した。S1 Nuclease 処理による PFGE 解析により耐性遺伝子はプラスミド上に存在する事が確認された。耐性遺伝子の伝達性は認めなかった。ligase 遺伝子の転写活性を調べたところ恒常的に発現していることが解った。

【考察】フランスから報告された VanN 型 VRE(*E. faecium*)は D-Ala^{4}-D-Ser^{5} ligase 遺伝子を持ち低度 VCM 耐性を示す。今回解析した VRE 株も低度耐性を示す *E. faecium* 株であり遺伝子構造からも VanN 型と考えられた。しかしフランスで見つかった株の VanN 型耐性遺伝子は伝達性を示したが今回国産鶏肉で見つかった VanN 型遺伝子もプラスミド上に存在したが伝達性は示さなかった。これら 2 つの VanN 型 VRE 株は物理的に遠く隔たる事から現在のところ関連性は不明である。一方で少数であるが VanN 型 VRE 株が環境中に存在し既に拡がっていることを示している。

病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構

○田辺公一、名木　稔、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮崎義継
国立感染症研究所　生物活性物質部

【背景・目的】
病原真菌 *Candida glabrata* は、感染宿主体内において細胞外ステロールを取り込み、生育に利用すると考えられており、ステロール合成を阻害する抗真菌薬に対する低感受性と関連があると推測される。しかし通常の実験培地中ではステロールの取り込みは観察されないことから、宿主体内における生育環境の変化がステロール取り込み活性化の原因であると考えられる。本研究では、*C. glabrata* におけるステロール取り込みの活性化機構と宿主体内における生理的役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】
高浸透圧や高温などの様々なストレス環境下で菌を培養し、ステロールトランスポーター遺伝子 *AUS1* の発現が誘導され、ステロール取り込みが活性化されるような培養条件を探索した。ステロール取り込みの活性化は、薬剤によってステロール合成を阻害した状態で、細胞外からステロールを供給し、菌の生育能が回復するかどうかで評価した。また、*AUS1* を破壊した *C. glabrata* 株を用いてマウス感染実験を行い、臓器定着率がステロール取り込みの有無で変化するかどうかを調べた。
【結果・考察】
ステロール取り込みを活性化する培養条件のスクリーニングの結果、鉄欠乏がステロール取り込みを活性化し、ステロールトランスポーター遺伝子 *AUS1* の発現を誘導することを明らかにした。宿主体内特に血液中の遊離鉄濃度は低いため、鉄欠乏刺激がステロール取り込みを誘導した結果は妥当であると考えられた。また脂質分析により、鉄欠乏条件下で細胞内にステロールが取り込まれることを確認した。鉄欠乏条件下で網羅的遺伝子発現解析を行った結果、*AUS1* 以外にもステロール取り込みに関与すると推測される遺伝子（*OSH4, TIR3*）の発現量の増加が認められた。また、*AUS1* の破壊株は野生型株と比較して腎臓への定着率が有意に低下していたことから、*AUS1* を介したステロールとりこみが *C. glabrata* の宿主体内での生存にも重要な役割を果たすことが示唆された。

大学病院におけるメロペネムおよびドリペネムの使用量とメロペネムの緑膿菌に対する感受性との関連性

[1]大阪大学医学部附属病院 感染制御部、[2]大阪大学医学部附属病院 薬剤部
○宮脇 康至[1,2]、関 雅文[1]、薮野 佳小里[2]、三輪 芳弘[2]、浅利 誠志[1]、朝野 和典[1]

【目的】カルバペネム系抗菌薬の適正使用は、緑膿菌における耐性化を防ぐために必須である。大阪大学医学部附属病院では、速やかな治療の開始が行えるよう、カルバペネム系抗菌薬使用前の届出制や許可制は導入していない。投与開始を原則自由とする代わりに、処方動向をモニタリングし、8日間以上の継続投与例には、抗菌薬継続使用届出書の提出を依頼している。今回、カルバペネム系抗菌薬の使用と緑膿菌における薬剤感受性の関連性について検討を行ったので報告する。
【方法】調査期間は2003年から2011年までの9年間とし、カルバペネム系抗菌薬の使用量（AUD）および緑膿菌のカルバペネム系抗菌薬に対する薬剤感受性を調査した。また使用量と薬剤感受性との関連性の評価にはピアソンの相関係数を用いた。
【結果】カルバペネム系抗菌薬のAUDは、2003年の17.55から2010年の9.73まで有意に減少したが、2011年は13.12まで増加した。メロペネム(MEPM)のAUDは、2010年までは有意に減少したが、2011年には増加した。これは、1 g×3回投与症例増加のためと考えられる。イミペネム・パニペネムの AUD は有意に減少したが、ドリペネム(DRPM)のAUDは、逆に増加した。ビアペネムは、ほぼ一定であった。MEPMとDRPMのTotal AUDは、2003年から2010年までほとんど変化がなかった。緑膿菌の分離数は、年間470株前後であった（2004年：480株、2007年：488株、2009年：468株）。緑膿菌のMEPM感受性は、年々改善し、2004年の83%から2010年には94%となった。MEPMのAUDと緑膿菌のMEPM感受性の間に、相関が認められた($r=0.859$, $p<0.005$)が、MEPMとDRPMのTotal AUDとMEPM感受性の間には、相関が認められなかった($r=-0.074$, $p=0.849$)。
【考察】院内感染対策により、多剤耐性緑膿菌の検出数は減少したが、緑膿菌の分離数には変化が認められなかった。MEPM使用からDRPM使用への変更により、MEPMとDRPMの Total AUD は変化していないにもかかわらず、MEPM の使用量が減少したことで、緑膿菌のMEPM感受性は改善した。MEPMとDRPMは、類似した作用・耐性メカニズムを持つため、互いに交差耐性を示すと考えられているが、緑膿菌のカルバペネム感受性の改善には、MEPM から DRPM も含めた他のカルバペネム系抗菌薬への変更が有効である可能性が示された。

医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の解析

○多田達哉、秋山徹、島田佳世、切替照雄
独立行政法人　国立国際医療研究センター研究所　感染症制御研究部

【背景】

多剤耐性緑膿菌は院内感染起因菌として全国の医療施設で大きな問題となっている。これまでの研究から、IMP-type メタロ-β-ラクタマーゼおよび aminoglycoside-acetyltransferase AAC(6')-Iae 産生株は全国に広がり、多くの医療施設において院内感染起因菌となっていることが明らかとなってきた。

【方法】

2009年から2011年にかけて全国から集められた多剤耐性緑膿菌臨床分離株 378株（2009～2010年分離株 217株、2011年分離株 161株）を用いた。これらの臨床分離株に対し、IMP-type メタロ-β-ラクタマーゼ、AAC(6')-Iae および AAC(6')-Ib イムノクロマトキットを用いて迅速診断した。イミペネム、アミカシンおよびシプロフロキサシンの MIC の測定し、分子疫学解析を行うと共に、β-ラクタム系薬およびアミノグリコシド系薬に対する薬剤耐性因子を同定し、日本で分離される多剤耐性緑膿菌における薬剤耐性因子の変化を比較した。

【結果および考察】

2009～2010年に分離された217株を解析した結果、IMP陽性174株（80.2%）、AAC(6')-Iae 陽性 145株（66.8%）、AAC(6')-Ib 陽性 21株（9.7%）であった。2011年に分離された 161株では、IMP 陽性 101株（62.8%）、VIM 陽性 1株、AAC(6')-Iae 陽性 80株(49.6%)、AAC(6')-Ib 陽性 35株(21.7%)であった。2010年までの臨床分離株に比べ、2011年分離株では IMP 陽性あるいは AAC(6')-Iae 陽性株が減少し、AAC(6')-Ib 陽性株が顕著に増加していた。すべての AAC(6')-Ib 産生株 66株における PFGE パターン解析では 60%の相同性で 5つのクラスターを形成し、最大のクラスターに含まれる 50株の内、30株（60.0%）は IMP-7 メタロ-β-ラクタマーゼを有していた。

本研究で分離されたアミノグリコシド耐性株 NCGM1588 は新規 aminoglycoside-acetyltransferase AAC(6')-Iaj を持っていた。*aac(6')-Iaj* 上流にはクラス I インテグロンが存在し、*aac(6')-Iaj* を含む integron は染色体 DNA 上に存在していることが分かった。AAC(6')-Iaj のアミノ酸配列は AAC(6')-Ia のアミノ酸と比較すると 70%の相同性であった。*aac(6')-Iaj* を大腸菌にクローニングし、各種アミノグシコシド系薬で MIC を測定すると、現在日本で広がっている AAC(6')-Iae に比べ、アルベカシンに対する耐性が高かった。

IPMに感受性（中間耐性）を示す メタロ-β-ラクタマーゼ産生 Enterobacteriacea の出現

鹿山鎮男[1,2)]、繁本憲文[1,2,3)]、桑原隆一[1,2,4)]、小野寺一[1,5)]、横崎典哉[1,6)]、大毛宏喜[1,7]、○菅井基行[1,2]

[1] 広島大学　院内感染症プロジェクト研究センター、[2] 広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科　細菌学、[3] 広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科　外科学、[4] 広島鉄道病院検査室、[5] 広島大学病院診療支援部感染症検査部、[6] 広島大学病検査部、[7] 広島大学病感染症科

2008年より広島県内で行っている Extended Spectrum beta Lactamase（ESBL）産生 *K. pneumoniae* のサーベイランスにおいて、imipenem（IPM）には感受性を示すが meropenem（MEPM）には耐性を示す *Klebsiella pneumoniae*（ISMRK, Imipenem-susceptible meropenem-resistant *K. pneumoniae*）が継続的に検出されている。ISMRKは47.2Kbの接合伝達性プラスミドであるpKPI-6上にメタロ−β−ラクタマーゼ（MBL）遺伝子 *bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}6}}$、ESBL 遺伝子 *bla*$_{\mathrm{CTX\text{-}M\text{-}2}}$ を保有している。同じカルバペネム系薬剤である IPM と MEPM に対して感受性が異なるのは、この *bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}6}}$ に由来する。pKPI-6は *E. coli* 臨床分離株（ISMRE: Imipenem-susceptible meropenem-resistant *E. coli*）にも見出されている。薬剤感受性の判定を IPM のみでスクリーニングしている施設においては、ISMRKの存在が脅威となる。近畿地区において分離された IPM 感受性ないし中間型耐性を示す MBL 産生腸内細菌科細菌 26 株について検討した結果、20 株は ISMRK(-E)、1 株は *bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}1}}$ 保有 *K. pneumoniae* であった。残り5株は同一の新規 IMP 型 MBL 遺伝子を保有しており、*bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}34}}$ と名付けた。*bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}34}}$ は接合伝達可能な約 80kbp のプラスミド上インテグロンに存在していた。IMP-34 は IMP-1 と比較して 1 アミノ酸残基が異なり、87 番目の Glu が Gly に置換していた。このように、IPM に感受性（中間型耐性）を示す腸内細菌科細菌は広範な地域に分布し、特徴的な薬剤感受性パターンは *bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}6}}$ 以外でも引き起こされることが明らかになった。腸内細菌科による *bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}1}}$、*bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}6}}$ 及び *bla*$_{\mathrm{IMP\text{-}34}}$ を保有したプラスミドを介した水平伝播に、今後も引き続き注意が必要である。

阪神地区における 91 淋菌臨床株の *gyrA* 、*parC* のアミノ酸変異とキノロン系抗菌薬への薬剤感受性の検討

神戸大学大学院医学系研究科腎泌尿器科学分野
○重村克巳、田中一志、白川利朗、三宅秀明、荒川創一、藤澤正人

背景

淋菌におけるキノロン系抗菌薬の耐性化は問題となっており、特にその標的遺伝子である *gyrA* と *parC* のキノロン耐性決定領域のアミノ酸の変異がそれと関連するといわれている。今回我々はキノロン系抗菌薬の耐性と *gyrA* と *parC* のアミノ酸変異の関連を検討した。

対象と方法

阪神間で分離された男子尿道炎由来の臨床淋菌株 91 株とし、それらより DNA を抽出しそのキノロン系抗菌薬の標的遺伝子の *gyrA* と *parC* のキノロン耐性決定領域の sequence を行い、そのアミノ酸変異のパターンと各種キノロン系抗菌薬の最少発育静止濃度(minimal inhibitory concentration: MIC)との関連を調べた。

結果

全 91 株中、70%を超える株で ciprofloxacin に耐性を示した。そして 4 種類のアミノ酸変異、すなわち *gyrA* での Ser-91-Phe, Ser-91-Ile, Asp-95-Gly と *parC* での Ser-88-Pro が 3 種類のキノロン系抗菌薬(ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin)の MIC と有意な相関を示した。

結論

関西地区の淋菌臨床株でのキノロン耐性決定領域でのアミノ酸変異のうち *gyrA* での Ser-91-Phe, Ser-91-Ile, Asp-95-Gly と *parC* での Ser-88-Pro がキノロン系抗菌薬耐性に重要である可能性が示唆された。

海外輸入事例及び国内事例に由来する多剤耐性*Acinetobacter baumannii*の解析

○丸山悠太[1], 外山雅美[2,3], 松井真理[3], 長野則之[2,3], 長野由紀子[3], 柴山恵吾[3], 荒川宜親[4]

[1]船橋市立医療センター　[1]小児科(初期臨床研修医), [2]微生物検査室

[3]国立感染症研究所　細菌第二部

[4]名古屋大学大学院　医学系研究科

【序文】海外では多剤耐性*Acinetobacter baumannii* (MDRAB)の流行が深刻な問題となってきているが，国内でも院内感染事例を含めその拡がりが懸念されている．本報では当センターで検出された海外からの輸入事例に加え千葉県の医療機関で分離された国内事例に由来するMDRABについて報告する．

【材料と方法】海外輸入事例として米国アリゾナ州留学中に交通外傷により現地の外傷センターで集中治療を受けた 20 歳代前半の男性の鼠径部浸出液より分離された MDRAB1 株及びタイ旅行中インフルエンザに罹患し現地の医療機関に入院した 70 歳代後半の男性の中間尿より分離された MDRAB (strain 1)と便より分離された strain 1 と薬剤感受性プロファイルが異なる MDRAB (strain 2)の 2 株を解析対象とした．また渡航歴のない 80 歳代前半の男性の留置カテーテル尿より分離された MDRAB を解析した．耐性決定因子 bla_{OXA}，bla_{ADC}，16S rRNA メチレース遺伝子の PCR 検出及び塩基配列解析を行った. DNA ジャイレース(GyrA), トポイソメラーゼ IV(ParC)のキノロン耐性決定領域内の変異を解析した．MLST は Bartual らと Institut Pasteur の二法により実施した．

【結果及び考察】解析株はカルバペネム系薬を含む全てのβ-ラクタム薬，キノロン系薬に耐性であった．しかしながらアミノグリコシド系薬の場合 4 株は gentamicin，amikacin に耐性であったが，arbekacin にはタイ国由来 strain 2 のみが感性である点が異なっていた．海外輸入事例由来の 3 株は IS*Aba1*-$bla_{\mathrm{OXA-23}}$ を保有していたが, IS*Aba1* の 5'末端側の IRL と $bla_{\mathrm{OXA-23}}$ との間のスペーサーは，米国由来株とタイ国由来 strain 1 が既報の多くの MDRAB で認められている 34 bp であったのに対してタイ国由来 strain 2 では 7 bp 欠失による 27 bp であった．さらに米国由来株は $bla_{\mathrm{OXA-69}}$，タイ国由来 strain 1 は IS*Aba1*-$bla_{\mathrm{OXA-66}}$，strain 2 は $bla_{\mathrm{OXA-66}}$ を有していた．国内由来株は IS*Aba1*-$bla_{\mathrm{OXA-82}}$ を保有していた(OXA-82 は OXA-66 の 1 アミノ酸違い)．米国由来株，タイ国由来 strain 1，国内由来株ではアミノグリコシド系薬の高度耐性に関与する *armA* が検出された．また全株で GyrA に Ser83Leu，ParC に Ser80Leu の置換が確認された．MLST 解析の結果 Bartual らの方法では米国株が ST135，タイ国株の strain 1 及び strain 2 が clonal complex 92 に属する ST 92 及び ST 189 と各々同定された．また Institut Pasteur の方法では米国株が ST1，strain 1 と 2 が ST 2 と同定された．なお Bartual らの CC 92 及び Institut Pasteur の ST 2 はいずれも世界流行株の European clone II に相当し, Institut Pasteur の ST1 は European clone I に相当するとされている．国内由来株については解析中である．

MDRAB は院内感染対策上極めて重要な耐性菌であり、今後海外輸入事例に加え渡航歴のない患者からの MDRAB の早期検出にも注意が払われるべきである。

健常人より分離されたCTX-M産生大腸菌における プラスミド伝達性fosfomycin耐性遺伝子*fosA*の広まり

○ 佐藤夏巳[1]、後藤謙介[1]、村竜輝[2]、善野孝之[2]、
中根邦彦[3]、川村久美子[1]、荒川宜親[3]
([1]名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻、[2]名古屋大学医学部保健学科、
[3]名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学)

【目的】腸内細菌科菌種の多剤耐性化は治療上深刻な問題であり、なかでも基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌の増加と多剤耐性化は使用薬剤を限定しつつある。Fosfomycin (FOM)は、40年以上前から尿路感染症などの治療に使用されてきた薬剤であるが、近年、多剤耐性グラム陰性桿菌による感染症の治療薬として見直されつつある。FOMは他の薬剤との交差耐性がなく、幅広い抗菌スペクトルを有することから、その効果が期待されているが、その一方で、すでに臨床分離株からプラスミド性FOM耐性遺伝子(*fosA3*, *fosC2*)が検出されはじめている。*fosA3*については$bla_{\text{CTX-M}}$と同一プラスミド上に存在することが証明されており、今後CTX-M保有プラスミドの広まりとともにFOM耐性遺伝子が拡散することが危惧される。これまでの調査で、我々は健常人の約数%が腸管内にCTX-M産生*Escherichia coli*を保菌していることを確認している。本研究ではこれらCTX-M産生*E. coli*におけるFOM耐性率およびプラスミド伝達性FOM耐性遺伝子*fosA*の保有について解析したので報告する。

【材料と方法】菌株は2010年1月～8月の間に健常人の糞便より分離されたCTX-M産生*E. coli* 145株(重複を除く)を対象とした。FOMのMICはCLSI(M7-A8)に準拠した寒天平板希釈法にて測定した。プラスミド伝達性FOM耐性遺伝子*fosA3*および*fosC2*の保有は、Wachinoらの報告(Wachino J *et al*. 2010. *J Antimicrob Chemother*)を基に作成したprimer setを用いたPCR法にて検索した。その他、ESBL関連遺伝子のタイピング(Shibata N *et al*. 2006. *Antimicrob Agents Chemother*)、血清型別、接合伝達試験およびInc typeの決定(Carattoli A *et al*. 2005. *J Microbiol Methods*)を実施した。

【結果と考察】CTX-M産生*E. coli* 145株中FOM非感受性株(MIC 128μg/ml≤)は9株(6.2%)であり、本邦(3.6%, 7/192)および韓国(4.8%, 8/165)の報告(Lee SY *et al*. 2012. J Antimicrob Chemother)と同程度であった。このうち5株が*fosA3*を保有していたが、*fosC2*保有株は認められなかった。接合伝達試験の結果、5株すべてで伝達性が確認され、Inc typeはInc N type 1株、IncF type 2株、IncI1 type 2株であった。得られた接合伝達株はすべて親株と同型の$bla_{\text{CTX-M}}$を有しており、健常人においてもCTX-M遺伝子とともにプラスミド伝達性FOM耐性遺伝子が広まっている可能性が示唆された。

マイクロデバイスを用いた簡易迅速感受性測定法

○松本佳巳[1]、榊原昇一[1]、飯野亮太[2]、野地博行[2]、西野邦彦[1]、山口明人[1]
1)大阪大学産業科学研究所、2)東京大学大学院・工学系

【目的】耐性菌の蔓延に伴い、必要性がさらに高まっている臨床分離菌の薬剤感受性測定について、18 時間を要する従来法に代わる、3 時間で結果が得られる多剤耐性緑膿菌 (MDRP) の検出を目指した簡易迅速法を考案し、昨年の本研究会において報告した。その後、検査に用いる微細加工デバイス（マイクロ流路）の流路の数を 6 本に増やし、デバイスの形状の改良を行うとともに、測定条件の最適化および判定法の標準化について検討した。

【方法】使用したマイクロデバイスは、微細加工技術を用いて、Polydimethylsiloxane (PDMS, TORAY) を 100℃、30min 加熱して固め、RIE-10NR (Samco)を用いた酸素プラズマ法によりカバーガラスに接着して作成した。計 6 本の流路は、菌の接種が 1 回で済むように注入孔を共有し、観察領域を空気孔（出口）近くに収束させて、観察し易くした。同時に 5 薬剤の検査が可能となり、ciprofloxacin (CPFX)、amikacin (AMK)および imipenem (IPM)に加えて ceftazidime (CAZ)および piperacillin (PIPC) に対する感受性測定を試みた。菌液を注入孔から接種し、密閉容器内で加湿しながら 37℃で 3 時間培養した後、顕微鏡で観察し、直後および 3 時間後のコントロールと比較して耐性／感受性を判定した。多剤耐性でない緑膿菌臨床分離株を用い、微量液体培地希釈法により接種菌量の影響を測定し、デバイスを用いた感受性測定法の判定基準の最適化を検討した。

【結果】デバイスの注入孔の形状を工夫し、菌液の注入がし易くなった。また、空気孔と観察領域の距離を等しくすることで、流路間の菌の増殖がより均一となり、かつ距離を短くすることで、緑膿菌の増殖速度が速まり、3 時間以内の判定に支障のある菌株はなかった。MDRP の指標となる 3 剤は、接種菌量の影響を受けにくく、デバイス法と従来法との相関に問題はなかったが、追加検討した CAZ および PIPC は、微量液体培地希釈法で検討した結果、高接種菌量で MIC が顕著に上昇した。CAZ は、培養後のコントロールとの差の有無を指標にすることで標準法と近い結果が得られたが、PIPC では、流路に用いたのと同じ菌量で、感受性株を含む全ての株が耐性となった。接種菌量を今までの 1/10 にすると、PIPC の感受性も標準法とほぼ一致し、判定にも支障はなかった。

【考察】同時に検査できる薬剤が 5 剤に増え、MDRP の検出だけでなく、有効な薬の選択にも使える可能性が広まった。緑膿菌は、感受性株であっても誘導型の染色体由来 β-lactamase を産生することから、PIPC のように β-lactamase の影響を受けやすい薬剤は、接種菌量を増やすことにより耐性傾向が強まるが、菌量を 1/10 にし、判定基準を培養後のコントロールとの比較による差の有無（半分以下の菌量）にすることで対応できると推定された。判定時の指標として、菌の増殖の有無と同時に薬剤の作用による形態変化も見ることができるというメリットを生かし、必要に応じて薬剤毎に詳細な判定基準を定めることも検討したい。この簡易迅速法は、緑膿菌以外の糖非醗酵菌に応用が可能であり、濃度を変更すればその他のグラム陰性菌にも有用であると考えられる。

緑膿菌の鉄獲得シグナル伝達系を標的としたスクリーニング系の開発

佐藤一樹、秋葉敬斉、安藤太助、磯貝恵美子、○米山　裕
（東北大学大学院農学研究科）

【目的】抗生物質の登場以来重篤な細菌感染症は減少の一途を辿り、感染症はもはや過去の病であるとの幻想を人々は抱くに至った。しかし、過剰な抗菌剤の使用の結果、各種多剤耐性菌が出現し公衆衛生上の大きな問題となっている。これら細菌感染症の脅威に対抗するためには新規抗菌剤の開発が必須であり社会的にも強く求められている。既存の抗菌剤は細菌の生存に必須な代謝過程を標的としており、同様なアプローチにより見出される新規抗菌剤についてもいずれ耐性菌が出現することは避けられない。一方、病原細菌が宿主に感染するために必要な病原因子は、細菌の生存自体には必ずしも必須ではないことから、その阻害剤に対する耐性菌の出現頻度は低いと考えられ、新規標的として注目を集めている。感染の場である宿主体内は鉄枯渇環境であることから病原細菌が感染するためには鉄獲得系の活性化が必要である。そこで、我々はこの鉄獲得系の活性化に至るシグナル伝達系を標的とした新規なスクリーニング系の開発を試みた。

【方法】緑膿菌のシデロフォアであるピオベルジンに特異的な外膜レセプターFpvA は鉄欠乏下でその発現が上昇する。また、本菌の主要な多剤排出ポンプである MexAB-OprM の外膜サブユニットである OprM 欠損変異株(ΔOprM)はポンプが機能せず薬剤に高感受性を示す。そこで、環境中の低鉄濃度に応答して OprM の発現が誘導される評価系を構築するために、ΔOprM 株の *fpvA* 遺伝子下流に野生型の *oprM* 遺伝子を配した組み換え株(PAM01)を作製した。そして、鉄過剰および欠乏条件下(0.5 mM ジピリジル存在下)でのアズトレオナム(AZT)およびクロラムフェニコール(CP)に対する最少発育阻止濃度(MIC)を評価した。また、OprM の発現は抗 OprM 抗体を用いたウェスタンブロット解析によって調べた。

【結果と考察】ΔOprM 株の AZT (0.25 μg/ml)および CP (2 μg/ml)に対する MIC は野生型(AZT, 4 μg/ml; CP, 32 μg/ml)に比べ著しく低い。一方、PAM01 株の AZT および CP に対する MIC は、鉄過剰条件下で各々0.25 μg/ml および 4 μg/ml であり、鉄欠乏下で 2 μg/ml および 16 μg/ml であったことから、*fpvA* 直下の *oprM* 遺伝子の発現が鉄欠乏条件下で誘導されたものと考えられた。この点を明らかとするために OprM の発現をウェスタンブロット解析した結果、鉄欠乏条件下で OprM の発現上昇が認められた。次に、この OpM の発現誘導が環境中の鉄濃度に依存したシグナル伝達系の活性化に依存した応答であるか否かを検討するために、ピオベルジンが関与したシグナル伝達系の正の制御因子である PvdS を破壊した PAM01 由来の誘導体 PAM02 を構築した。もし、PAM01 の薬剤に対する応答が鉄獲得系のシグナル伝達系の活性化によるものであるなら、PAM02 の鉄欠乏条件下での薬剤感受性は上昇せずΔOprM と同等であることが期待される。PAM02 の鉄欠乏下での AZT および CP の MIC はそれぞれ 0.5 μg/ml および 4 μg/ml であり、ΔOprM のそれと同レベルであった。このことから、PAM01 の薬剤感受性の変化は鉄欠乏条件に応答したシグナル伝達系の活性化を反映しており、本システムは鉄獲得シグナル伝達系の活性化を指標薬剤の感受性の変化として捉えることができる簡便なスクリーニング系であることが明らかとなった。

免疫蛍光抗体法による β-lactamase 産生菌迅速検出法の構築

〇 横山覚[1]、川村久美子[1]、黒崎博雅[2]、荒川宜親[3]
([1]名古屋大学大学院 医学系研究科 医療技術学専攻、[2]熊本大学大学院 生命科学研究部 構造機能物理化学分野、[3]名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病原細菌学)

【目的】メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌や KPC-型カルバペネマーゼ産生菌の拡散が国内外で大きな問題となっている。これら耐性菌は抗菌薬治療の切り札ともいえるカルバペネムを分解すると同時に、フルオロキノロンやアミノグリコシドにも耐性を獲得した多剤耐性菌であることが多く、感染症患者の予後の悪化が特に問題視されている。したがって、適切な抗菌薬選択のため、さらに感染制御の観点から、一刻も早い耐性菌検出が求められている。現在、臨床現場では様々な検出法が行なわれているが、それらの多くは培養同定検査後に実施されるため、迅速性に欠ける面があり、また耐性菌ごとに異なる検出法を行なうため、検査室への負担が増大しているのが現状である。そこで、本研究では検査材料からの直接検出をめざした迅速簡便検出法として、蛍光抗体法を用いた β-ラクタマーゼ産生菌検出法の構築を試みた。

【方法】検出対象は、IMP 型、VIM 型、NDM-1 型 MBL および KPC 型 β-ラクタマーゼとし、いずれの β-ラクタマーゼともそれぞれの型の中で共通する部分のアミノ酸配列とその立体構造から、抗原として適する 18-20 残基を選択し、抗体を作製した。菌株は各種 β-ラクタマーゼ陽性菌 3 株(KPC-型は 1 株、NDM-1 型は 2 株)、陰性対照には ATCC 株を用いた。各菌株は一夜培養後、MacFarland No.0.5 に調整したのち 10 μl をスライドガラス(松浪硝子)に塗布した。間接蛍光抗体法に使用する二次抗体は Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit igG (H+L) (Invitrogen)を使用し、固定法、各抗体の濃度、反応時間など間接蛍光抗体法の条件について検討した。結果の評価は顕微鏡による判定ならびに ImageJ (National Institutes of Health)による解析を行なった。

【結果・考察】固定法はアセトンが、一次および二次抗体の濃度および反応時間は各々1,000倍希釈で一時間反応させる条件が最も良好であった。この条件にて各種臨床分離株を染色したところ、大腸菌および肺炎桿菌については、IMP-型メタロ-β-ラクタマーゼ陽性菌は菌全体が均一に染まり、顕微鏡による判定でも陰性菌との判別が容易であった。また、KPC-型 β-ラクタマーゼ、NDM-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ陽性菌においても、顕微鏡による判定が可能であった。緑膿菌については、IMP-型, VIM-型メタロ-β-ラクタマーゼともに陽性菌は菌体内にドット状斑点として染色され、陰性菌もやや光る傾向にあった。このように緑膿菌は、顕微鏡による判定が腸内細菌科菌種と比べると明瞭でないため、ImageJ による解析を行なったところ、陰性菌に比して陽性菌の蛍光強度が強い傾向にあった。現在、菌株数を増やして、有意差があるか、また cut off 値の設定が可能であるかを検討中である。

パイロシークエンスを用いた ***Acinetobacter baumannii*** 流行株の迅速検出方法の検討

〇松井 真理[1]、鈴木 里和[1]、鈴木 仁人[1]、柴山 恵吾[1]、荒川 宜親[1,2]
1. 国立感染症研究所 細菌第二部　　2. 名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の増加が世界中で問題となっている。中でも、世界流行株とされる European clone II（EU clone II）系統株は、多剤耐性株・アウトブレイク起因株として多くの報告がある。本研究では、EU clone II 系統株の迅速検出方法の構築を目指し、サンガーシークエンス法に比べて迅速にシークエンス結果が得られるパイロシークエンスによる検出法を検討した。
【方法】2000 年から 2011 年に日本国内の医療機関で分離されたアシネトバクター属のうち、遺伝子学的手法により *A. baumannii* と同定され、かつ PFGE で異なるバンドパターンを示す 37 株と ATCC 株 2 株の合計 39 株を対象とした。EU clone II 系統株は、Bartual ら、Pasteur 研究所の両手法の Multilocus sequence typing (MLST)法により判定した。*A. baumannii* のみが有する $bla_{\mathrm{OXA\text{-}51\text{-}like}}$ 遺伝子型を株間で比較し、EU clone II 系統株に特異的な遺伝子配列領域をパイロシークエンスによる検出に用いた。
【結果】*A. baumannii* 39 株のうち、Bartual らの手法を用いた MLST 法で Clonal complex 92 (CC92)に分類された 21 株は全て、Pasteur 研究所の MLST 法では Sequence Type 2 (ST2)に分類された。これら 21 株を EU clone II 系統株と判定した。$bla_{\mathrm{OXA\text{-}51\text{-}like}}$ 遺伝子型は、$bla_{\mathrm{OXA\text{-}66}}$、$bla_{\mathrm{OXA\text{-}82}}$、$bla_{\mathrm{OXA\text{-}83}}$ のいずれかであった。他の 18 株は、いずれも EU clone II 系統株と異なる $bla_{\mathrm{OXA\text{-}51\text{-}lke}}$ 遺伝子型を有していた。$bla_{\mathrm{OXA\text{-}51\text{-}like}}$ 遺伝子配列を比較し、EU clone II 系統株特異的な配列（nt106-108）を、パイロシークエンスによる検出対象領域とした。*A. baumannii* 39 株は、パイロシークエンスの結果から 4 グループに分類され、EU clone II 系統株はそのうちの単一グループを形成した。
【結論】 パイロシークエンス法を用いて、迅速に *A. baumannii* EU clone II を検出する方法を構築した。本手法は、流行株のスクリーニングに有用と考えられた。

異物排出輸送の構造的基礎

中島良介、櫻井啓介、○山口明人　（大阪大学産業科学研究所）

異物（多剤）排出タンパクは、細菌から高等生物までほとんど全ての細胞に内在する基本的な生体防御装置である。しかし、その過剰発現は多剤耐性を引き起こし、がんや細菌感染症の化学療法における脅威となっている。臨床的に有効な治療薬がほとんど無い多剤耐性緑膿菌(MDRP)においても、RND型異物排出タンパク MexB, MexY の過剰発現が見られ、その阻害剤と抗菌剤の併用により抗 MDRP 効果が見られるとの報告があるが、阻害剤の実用化には至っていない。

私達は 10 年前に世界で初めて、大腸菌の RND 型異物排出タンパク AcrB の結晶構造決定に成功し[1]、以後、薬物結合構造、阻害剤結合構造などの決定を通じて、異物排出輸送機構の解明を進めてきた。また、MexY, MexB をともに阻害する新しいユニバーサル阻害剤の蛋白構造に基づく創薬(SBDD)を進めている。

よく知られているように、異物排出タンパクの最大の特徴は、その非常に広範な排出スペクトルである。排出される基質は薬物・毒物に留まらず、界面活性剤や色素、細菌毒素や老廃物から細胞間情報分子にまで及ぶ。化学構造的には芳香族、脂肪族両方を含み、共通性は見出しがたい。私達は 2002 年の AcrB 構造決定により、異物排出タンパクは脂質二重層表層から基質を取り入れる細胞膜の掃除機(membrane vacuum cleaner)であることを示した[1]。その後、他のグループによってなされた ABC 型異物排出タンパクの構造決定によっても、基質は脂質二重層表層から排出される構造になっていることが証明されている。すなわち、異物は一般に脂質二重層を通って細胞内に侵入する経路を採る事が多いことから、このメカニズムにより異物を区別するとともに、効率的に水際排除する普遍的な機構となっていると考えられる。

その後、2006 年に薬物結合構造を決定し[2]、ホモ 3 量体の 3 つのモノマーが待機、結合、排出という別のコンホメーションを取っていて、順繰りに構造変化することにより基質を排出するという機能的回転輸送モデルを提出した。また、多剤の認識については、マルチサイト結合が基礎にあることを明らかにした。さらに、2011 年、大分子量薬物との結合構造を決定し[3]、マルチサイト結合ポケットが 2 つあること。基質はこの 2 つのポケットをタンパク質の蠕動運動によって送られていき、最終的に排出されるペリスタポンプ機構を明らかにした。

さらに、初めて AcrB と MexB 双方の阻害剤ピリドピリミジン(PP)との結合構造決定にも成功し、阻害剤結合ピットを発見した[4]。MexY の対応部位との比較により、PP が MexY を阻害できない構造的理由がわかり、現在その情報を元に MexY を阻害する化合物を分子設計している。

References

1) Murakami et al. ***Nature*** **419**, 587-593 (2002).
2) Murakami et al. ***Nature*** **443**, 173-179 (2006).
3) Nakashima et al. ***Nature*** **480**, 565-569 (2011)
4) Nakashima et al. ***Nature*** under review (2012)

メタロ-β-ラクタマーゼ活性阻害におけるメルカプトカルボン酸の至適炭素鎖長の決定と加水分解反応速度に及ぼすアニオンの影響

○黒崎博雅[1]，山口佳宏[2]，荒川宜親[3]

[1]熊本大学大学院生命科学研究部構造機能物理化学分野，[2]熊本大学環境安全センター，[3]名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学／耐性菌制御学

以前，我々は，IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ(以下，IMP-1)による基質加水分解を阻害する化合物を検索したところ，チオール基を有する低分子化合物が阻害作用を示すことを見出した。なかでも，メルカプト酢酸は阻害定数 $K_i = 0.23$ μM，2-メルカプトプロピオン酸 $K_i = 0.19$ μM，3-メルカプトプロピオン酸 $K_i = 1.2$ μM であり，分子内にチオールとカルボン酸を持つ化合物が IMP-1 に対して酵素活性を強く阻害することがわかった。そこで，3-メルカプトプロピオン酸よりも炭素鎖が 1 つ長い 4-メルカプト酪酸の IMP-1 に対する阻害作用を検討した。

［実験］　所定の濃度となるようにメタノールで希釈した 4-メルカプト酪酸 0.1 mL と基質がニトロセフィン(NTC)の時は63 nM, セファロリジン(CER)の時は4.72 μM の IMP-1 溶液 0.1 mL を Tris 緩衝液 2.8 mL に加え全量 3.0 mL とし，30°C で 10 分間インキュベートした後，各濃度の基質溶液 0.1 mL を加え，すばやく振り混ぜ，基質加水分解を 3 分間測定した。ここで，共存させた 4-メルカプト酪酸の濃度は基質が NTC の時 0, 10, 50 μM, CER の時 0, 50, 100, 200 μM とした。また，基質濃度は NTC の時 1, 2, 3, 4 μM，CER の時 5, 10, 20, 40 μM とした。

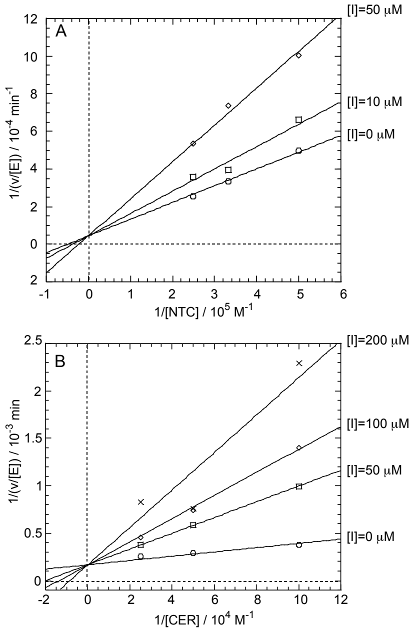


Fig.1. Plots of 1/(v/[E]) against 1/[S] for hydrolysis of NTC (A) and CER (B) by IMP-1 in the presence of 4-mercaptobutyric acid.

［結果・考察］　Lineweaver-Burk プロットより，4-メルカプト酪酸は縦軸の切片，つまり $1/(v/[E]_0)$で直線群が 1 点に交わっていることから，4-メルカプト酪酸による IMP-1 活性阻害は拮抗阻害であると考えられる。NTC と CER を基質とした時，IMP-1 に対する 4-メルカプト酪酸の K_iはそれぞれ 44 μM，37 μM となり，ほぼ一致した。これはこの阻害が基質によらないことを示している。また，炭素鎖数 3 の 4-メルカプト酪酸は炭素鎖数 2 の 3-メルカプトプロピオン酸よりも阻害定数は大きくなった。従って，これ以上炭素鎖を長くしても阻害が強くなることは期待できないと考えられる。

また，IMP-1 による基質加水分解へのハロゲンイオン，硝酸イオンなどの阻害作用についても検討したので報告する。

新型メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の構造機能解析

○和知野純一[1)]、山口佳宏[2)]、森茂太郎[3)]、黒崎博雅[4)]、
柴山恵吾[3)]、荒川宜親[1)]

[1)] 名古屋大学大学院医学系研究科、[2)] 熊本大学環境安全センター、
[3)] 国立感染症研究所細菌第二部、[4)] 熊本大学大学院生命科学研究部

【目的】*Serratia marcescens* より単離した新型メタロ-β-ラクタマーゼ（以下 MBL）SMB-1 の酵素機能をあきらかにするために、X 線結晶構造解析を行った。

【方法】蛋白発現系の構築には、*E. coli* BL21 (DE3)pLysS と pET30a ベクターを用いた。陽イオン交換カラムとゲルろ過カラムを用いて、蛋白精製を行った。結晶化の初期条件については各種スクリーニングキットを用いて探索し、さらに最適化することで、X 線結晶構造解析に至適な結晶を得た。回折データの回収は放射光科学研究施設（Photon Factory）にて行った。位相は分子置換法にて決定した。

【結果および考察】最終的に、SMB-1 の構造を 1.6 Åにて決定することができた。SMB-1 は MBL の中でもサブクラス B 3 MBL に属するものである。SMB-1 の全体像は、既に構造が決定されているサブクラス B3MBL（AIM-1, L1, BJP-1 など）のものと酷似していた。しかし、N 末端および活性中心付近に位置する 2 つのループ領域（ループ 1 およびループ 2）においては構造上違いが見られた。SMB-1 の N 末端は他のサブクラス B3MBL のものに比べ、短かった。ループ 1 にあるグルタミン(157)の側鎖は、活性中心を向いており、基質となるβ-ラクタム薬の認識に関与するものと予測された。グルタミン(157)は SMB-1 および AIM-1 のみにあり、他のサブクラス B3MBL には存在しない。そこで、グルタミン(157)をアラニンに置換した変異体を作製し、MIC および酵素学的パラメータを算出した。その結果、アラニンに置換することで、各種β-ラクタム薬に対する MIC 値は下がり、また、触媒効率も低下することがわかった。したがって、グルタミン(157)は SMB-1 の酵素活性に関与している部位であることがあきらかとなった。

また、細菌検査室で MBL 産生菌のスクリーニング法に応用されているメルカプト酢酸（MBL 阻害剤）について、SMB-1 との複合体構造が得られたので、併せて紹介したい。

メタロβ-ラクタマーゼ（MBL）産生緑膿菌による人工呼吸器関連肺炎（VAP）モデルにおける MBL 阻害薬 ME1071 の有効性

長崎大学病院　検査部[1]　長崎大学病院　第二内科[2]

〇山田康一[1,2]、柳原克紀[1,2]、賀来敬仁[1]、原田陽介[1,2]、右山洋平[1,2]、長岡健太郎[1,2]
森永芳智[2]、泉川公一[2]、掛屋　弘[2]、山本善裕[2]、河野　茂[2]

【目的】近年メタロβ-ラクタマーゼ（MBL）産生菌が問題となっている。MBL 阻害薬である ME1071 は MBL を競合的に阻害し、緑膿菌をはじめとする MBL 産生菌に対するカルバペネム系抗菌薬の抗菌活性を向上させることが期待される。*In vitro* では ME1071 が MBL 産生緑膿菌に対して有効であることが示されている。今回我々は MBL 産生緑膿菌による人工呼吸器関連肺炎（VAP）モデルを用いて ME1071 の有効性を検討した。

【方法】ddY SPF マウス（雄、6 週齢）を使用した。菌株は臨床分離された MBL 産生緑膿菌株を使用した。5mm の長さに切断した 3Fr の静脈用カテーテルチューブをマウスに経気道的に挿入し、気管支内に留置した。その後 1～5×10^7CFU/ml に調節した緑膿菌を 50µl 経気道的に投与して、VAP モデルを作成した。治療としてビアペネム（BIPM 100mg/kg）もしくは BIPM（100mg/kg）+ME1071（100mg/kg）を 1 日 2 回 12h 毎に 7 日間腹腔内に投与した。非治療群として生理食塩水を同様に投与した。7 日後の生存率、感染 30h 後の肺内生菌数、肺病理組織像、気管支肺胞洗浄中の細胞数、好中球数、サイトカイン（IL-1β、IL-6、TNF-α）、初回投与時の BIPM ならびに ME1071 の体内動態について検討を行った。

【結果】使用した菌株の MIC は微量液体希釈法にて、BIPM 単独で 256µg/ml,であったが BIPM+ME1071 併用にて 8µg/ml まで低下した。併用群では BIPM 単独群、コントロール群に比べ明らかに生存率は高かった（$P<0.05$）。また感染 30h 後の肺内生菌数も併用群では単独群、コントロール群に比べ明らかに減少していた（4.40±0.22，5.27±0.34，6.25±0.43$\log_{10}$CFU/ml, $P<0.05$）。病理学的検討にても併用群では肺胞腔内への炎症細胞の浸潤は軽度であった。気管支肺胞洗浄中の総細胞数、好中球数、サイトカインに関しても併用群で明らかに低下していた（$P<0.05$）。血漿中における BIPM の%T＞MIC は単独投与時には 0%であるのに対し、併用時は 10.3%まで上昇していた。また ME1071 は BIPM よりも半減期が長く、BIPM の体内動態に大きな影響を及ぼさなかった。

【考察】BIPM＋ME1071 の併用は MBL 産生緑膿菌による VAP モデルにおいて有効であった。本研究は ME1071 が MBL 産生緑膿菌感染症に対する新たな治療戦略となる可能性を示唆するものである。

緑膿菌のカルバペネム耐性に関与する新規遺伝子の解析

○谷本 弘一[1]、富田 治芳[1,2]

[1]群馬大学大学院医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設、
[2]群馬大学大学院医学系研究科 細菌学

【はじめに】

カルバペネム系抗菌薬は抗緑膿菌薬として重要な薬剤である。カルバペネム高度耐性はメタロ-β-ラクタマーゼによるものが重要で、緑膿菌の低度カルバペネム耐性をもたらす機構としては外膜タンパク質 OprD の欠損、排出ポンプの機能亢進、染色体性 *ampC* の過剰発現が知られている。このたび我々はカルバペネム低度耐性に関与する遺伝子を検索する目的でトランスポゾンによる突然変異誘発を行った。得られた変異体のカルバペネム耐性を調べることによりカルバペネム耐性に関与する新規遺伝子を見出したので報告する。

【材料と方法】

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）PAO1 株を親株として用いた。トランスポゾンによる変異誘発用プラスミドとして pTn*Mod*-OGm を用いた。大腸菌 DH5α内でヘルパープラスミド pRK2013 と共存させ、PAO1 株へ接合伝達を行う事によって PAO1 株染色体のトランスポゾンによる変異誘発を行った。新規遺伝子の機能確認のための相補性試験や欠失変異の導入には pYM101 と pDS132 をそれぞれ用いた。

【結果と考察】

独立に 5000 回の突然変異誘発実験を行い、1 実験から 2 個の変異体を分離することにより計 10000 株を得た。イミペネムに対する MIC が 4 倍以上あるいは 1/4 以下に変化した株をカルバペネム耐性に関与する遺伝子に変異が起きた可能性がある株として分離し、トランスポゾンの挿入位置を決定した。その結果、すでにカルバペネム耐性への関与が知られている遺伝子の中で *copS*、*oprD*、*ampC* への挿入変異によってイミペネムに対する MIC が変化している株が得られた。一方、機能が明らかとなっていない 2 成分系のセンサー蛋白をコードすると思われる ORF に挿入変異を持つ株のイミペネムに対する MIC が上昇していた。この ORF に欠失を導入した PAO1 株では挿入変異体と同程度に MIC が上昇した。また、この欠失変異体からセンサー遺伝子に対応するレギュレーター遺伝子を欠失させると MIC は低下し、そのレギュレーター遺伝子を過剰発現させると MIC が上昇した。その結果からセンサー遺伝子の欠損によってレギュレーター遺伝子の発現が亢進しイミペネムに対する MIC が上昇したことが示唆された。

緑膿菌多剤耐性株における *mexS*–*mexT* 遺伝子による耐性制御

○間世田 英明[1]、上手 麻希[1]、中江 太治[2]、市瀬 裕樹[1]、白井 昭博[1]、大政 健史[1]
([1] 徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部、[2] 北里大学研究所 抗感染症薬研究センター)

緑膿菌は院内感染の原因菌であり、抗生物質への曝露により、容易に高度多剤耐性株が出現することから、非常に問題視されている。そのような高度多剤耐性株の一つである *nfxC* 変異株では、ゲノムでの調節遺伝子 *mexT* の出現に伴い、①MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの高発現による耐性化と②Quorum-sensing(QS)機構の抑制による弱毒化とMexAB-OprM ポンプの発現抑制による ß-lactam 剤への感受性化が同時に引き起こされている。我々は、現在までに、MexT が *mexEF-oprN* オペロンの上流域に直接的に結合することにより多剤耐性化を誘導することを明らかにしてきた。最近、K. Poole らにより、一部の臨床分離株では、MexEF-OprN ポンプの転写誘導が *mexT* 遺伝子に隣接する *mexS* 遺伝子によっても抑制されることが示された。しかしながら、*nfxC* 変異株のもう一つの特徴である QS 機構への影響や標準株である PAO1 株での *mexS* 遺伝子の役割については全く検討されていない。そこで、今回その 2 点について詳細に検討を加えた。

まず、機能型の *mexS* 遺伝子を *nfxC* 変異株に導入し、QS 機構への影響を検討した。その結果、*nfxC* 変異株では MexS の発現により、QS 機構の制御下にあるピオシアニンの産生量が野生株レベルまで高められた。また QS 機構の制御下にある MexAB-OprM ポンプの排出基質に対する MIC 値を測定したところ、先程同様 MexS の発現により野生株レベルまで耐性化した。このことから、MexS は MexT による QS 機構の抑制を解除することが初めて明らかとなった。次に MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの発現に及ぼす MexS の影響について検討した。その結果、臨床分離株由来の *nfxC* 変異株では、機能型の *mexS* 遺伝子の導入により、MexEF-OprN ポンプの排出基質に対する MIC 値が野生株レベルまで低下した。しかしながら、標準株である PAO1 株では、既往の報告とは異なり、機能型の *mexS* 遺伝子を導入しても全く変化が認められなかった。以上のことから、MexS による MexEF-OprN ポンプの発現調節は、MexT とは異なり MexEF-OprN ポンプの発現をコントロール可能な株とそうでない株が存在することが明らかとなり、MexS による MexEF-OprN の発現調節には未知の因子が介在しているものと推察された。

犬由来大腸菌におけるフルオロキノロン耐性およびセファロスポリン耐性の関連

○佐藤豊孝[1] 横田伸一[2] 大久保寅彦[1] 臼井　優[1] 藤井暢弘[2] 田村　豊[1]
１）酪農学園大・獣医・食品　２）札幌医大・医・微生物

【はじめに】

伴侶動物医療において各種の細菌性感染症治療に人の医療において特に重要な抗菌薬とされるフルオロキノロン(FQ)系と第 3 世代セファロスポリン(CEP)系抗菌薬が多く使用されており、その使用に伴うFQおよびCEP耐性菌の出現が問題となっている。さらに、より高リスクなFQおよびCEPの両方に耐性を示す大腸菌の出現が人の医療現場で多く報告され、詳細な病原性および疫学的解析が行われている。一方、伴侶動物においてもFQ-CEP 耐性大腸菌の報告があるがその詳細な解析はなされていない。今回、犬由来大腸菌を用い FQ および CEP 耐性の関連性について検討した。

【材料および方法】

酪農学園大学付属動物病院および江別市内の動物病院に来院した犬由来 FQ 耐性大腸菌(14 株)、CEP 耐性株(10 株), FQ-CEP 耐性株 (22 株)、FQ および CEP 両感受性株(Susceptible, 35 株)を用い系統発生分類、病原遺伝子の検索を行った。さらに系統 D に属した株については O 群血清型別、PFGE および MLST 解析を行った。

【成績】

Susceptible group の主要な系統は B1(34.3%)および B2(40.0%)であったが、FQ 耐性株群(50.0%)、CEP 耐性株群(40.0%)および FQ-CEP 耐性株群(59.1%)の主要な系統は D であった。また、FQ 耐性株群と FQ-CEP 耐性株群の間に系統発生分類の分布に有意な相関が得られた(r =0.98)。しかし、CEP 耐性株群と FQ-CEP 耐性株群の間に相関は認められなかった(r =0.58)。系統 B2(平均 8.9)は最も病原遺伝子保有数が多く、次いで系統 D(平均 5.3)、系統 B1(3.9)、系統 A(3.3)の順であった。平均耐性薬剤数は系統 D が最も多く(平均 6.6 剤)、次いで系統 A(5.8 剤)、系統 B1(5.3 剤)、系統 B2(2.5 剤)の順であった。系統 D に属する株を用いた PFGE 解析では 4 つのクラスター(I~IV)に分類され、FQ 耐性株および FQ-CEP 耐性株はクラスターI および II、CEP 耐性株および Susceptible はクラスターIII および IV に属した。さらに、クラスターI はサブクラスターIa、Ib および Ic に分類され、Ia に属した 10 株(FQ 耐性株、FQ-CEP 耐性株共に 5 株)は全て血清型 O1 および ST648 であった。D-O1-ST648 は他の系統 D に属する株より *kspM*, o*mpT* および PAI の保有率が有意に高かった。

【考察】

系統 D は最も多剤耐性を示し、病原遺伝子保有数も 2 番目に多いことから、系統 D は犬の臨床現場において最も注意が必要な大腸菌であると考えられた。また、系統発生分類および PFGE 解析の結果から FQ-CEP 耐性株の出現は FQ 耐性株に CEP 耐性が付随することによると考えられた。今回の研究で、特定のクローングループ、D-O1-ST648 が FQ または FQ と CEP の両方に耐性を示しさらに多くの病原性遺伝子を保有しながら広がっていることが明らかになった。ST648 は近年人の臨床現場からも多く報告されていることからも今後その動向に注意が必要である。

薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割

〇臼井　優[1)]、岩佐　友寛[1)]、佐藤　豊孝[1)]、大久保　寅彦[1)]、田村　豊[1)]
[1)]　酪農学園大学

【目的】
家畜における薬剤耐性菌の出現・拡散は、食品を介して人に伝播し人の健康に影響することが示唆されている。ハエは畜舎及び人の生活環境に存在し、食物を汚染することから、薬剤耐性菌を家畜から人へ伝播するベクターとなっている可能性がある。そこで、畜舎の牛糞便及びハエから大腸菌を分離し薬剤感受性を調べた。そして、耐性菌の中でも特に拡散が懸念される第 3 世代セファロスポリン系薬剤に対して耐性を示す基質特異性拡張型β - ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌に注目して遺伝学的近縁性を調べた。

【材料及び方法】
牛舎内の糞便 93 検体と牛舎内ハエ（イエバエ 91 検体、オオイエバエ 68 検体及びサシバエ 72 検体）から大腸菌の分離を行った。微量液体希釈法による薬剤感受性試験（13 薬剤）、PCR 法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*)の検出及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った。ESBL 産生大腸菌については、接合伝達試験、プラスミドプロファイル及びレプリコンタイピングを行った。

【結果及び考察】
牛糞便、イエバエ、オオイエバエでそれぞれ 74、64、54 株の大腸菌が分離され、いずれの由来株においてもテトラサイクリンに対する耐性菌出現率が最も高かった(36～50%)。第 3 世代セファロスポリン系薬剤に対して耐性を示したのは、牛糞便、イエバエ、オオイエバエ由来株でそれぞれ 6,20,8 株であり、$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$遺伝子保有株が多かった(6,11,5 株)。これら $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$遺伝子保有大腸菌 22 株は、多剤耐性（6 薬剤）であり、PFGE 解析を行ったところ、大きく 2 つのクラスターに分かれ、牛糞便及びハエ由来株で相同性が 80%以上と近縁な分離株が見つかった。以上の結果より大腸菌が牛糞便からハエに伝播していることが示唆された。また、$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$遺伝子保有大腸菌 22 株のプラスミドは全てレプリコンタイプ FIB（約 120kbp）であり、伝達性を示した。以上の結果は、牛舎内で $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ 遺伝子プラスミドが接合伝達により拡散していることを示唆した。ハエは腸内に病原性細菌を保有することが知られており、家畜由来耐性菌がハエ腸内において遺伝子を水平伝播することが懸念される。

ヒトの病原菌由来R プラスミドと高い相同性を有する魚類病原菌*Aeromonas hydrophila*の多剤耐性R プラスミド

○青木 宙[1,2]、Chris S. del Castillo[2], 引間 順一[2], Ho-Bin Jang[2], 竹山 春子[3], Tae-Sung Jung[2]

[1] 早稲田大学 先端科学・健康医療融合研究機構、[2] Aquatic Biotechnology Center of WCU Project, Gyeongsang National University、[3] 早稲田大学理工学術院 先端生命医科学センター

Aeromonas hydrophila は、ヒト、家畜および魚と広く感染する病原細菌である。近年、タイのティラピア養殖場において分離された *A. hydrophila* から多剤薬剤耐性 R プラスミド pR148 が検出された。この pR148 の全塩基配列を決定したところ、165,906 bp の環状 DNA で、147 遺伝子をコードしており、ヒト病原性大腸菌より検出された pNDM-1_Dol1 と高い相同性を示した。また、ヒト, 家畜、食品そして魚類から分離された他の IncA/C プラスミドとも高い類似性を示した。pR148 は水銀耐性オペロンや Tn*21* 型トランスポゾン内にコードされたⅣ型分泌装置関連遺伝子群を含んでいた。さらに、薬剤耐性遺伝子としては、*qacH*、$bla_{\mathrm{OXA-10}}$、*aadA1* および *sul1* がクラス 1 インテグロンの中に、*tetA* および *tetR* は Tn*1721* トランスポゾン内にコードされていた。また、*catA2* および複製された *sul1* がコードしている領域は、魚類より分離された IncU プラスミド、pRA3 および pAr-32 中の領域と完全に一致した。$bla_{\mathrm{OXA-10}}$ および *aadA1* 遺伝子は *Acinetobacter baumannii* AYE 染色体ゲノム中にコードされているものと 100％一致した。このような pR148 とヒトの病原細菌由来のプラスミドとの高い類似性は、お互いのプラスミドどうしで遺伝子の組換えが起こったか、あるいは共通した起源から伝達したことが推察される。これまでの研究から、IncA/C プラスミドの基盤となるバックボーン配列は保存されており、薬剤耐性遺伝子のようなアクセサリー遺伝子群が部分的に挿入されたものと考えられた。これらの結果は、ヒトや家畜における無差別的な薬剤使用の危険性を示しており、どのようにして薬剤耐性決定因子が伝播していくのか解明する必要がある。

小児3次医療機関の入院患者における便中 ESBL 産生菌の保有率

○南 希成[1,2]、川上 由行[5]、庄司 康寛[1,2]、笠井 正志[1,2]、小木曽 嘉文[2]、
中村 友彦[2]、齋藤 義信[3]、葛本 佳以[3]、久保田 紀子[3]、湯本 佳代子[3]、石井 絹子[2,4]
（長野県立こども病院 [1]総合小児科、[2]感染制御室、[3]臨床検査科、[4]看護部、
[5]信州大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 医療生命科学分野）

小児科3次医療機関である長野県立こども病院の一般病棟入院患者（小児集中治療室と新生児科病棟を除く）において、12%（6/50）の糞便から9株の ESBL 産生菌（以下 ESBL+）が分離された。分離菌の内訳は、*Citrobacter freundii* (3), *Citrobacter amalonaticus* (1), *Enterobacter aerogenes* (1), *Enterobacter agglomerans* (1), *Serratia marcescens* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1) および *Escherichia coli* (1) だった（括弧内は分離数）。

分離された ESBL は、遺伝子解析よりすべて CTX-M-1 group に属すると判定された。

ESBL＋保菌率は、過去3カ月間の抗菌薬投与群では非投与群よりも高く（14.8% vs. 8.7%）、基礎疾患に循環器疾患を有する児が、有さない児より高かった（23.5% vs. 6.1%）。

CTX-M-1 group ESBL は国内外ともに最も多く分離されているタイプだが、当院施設内での水平伝播の可能性も否定できないと思われた。引き続きサーベイランスや抗菌薬適正使用などの対策を強化・継続する必要がある。

当院における抗菌薬適正使用推進の取り組みと薬剤耐性菌検出状況

○渡邉珠代[1], 丹羽隆[1,2], 太田浩敏[1,3], 鈴木智之[1], 土屋麻由美[1], 伊藤善規[2],
清島満[3], 村上啓雄[1],藤本修平[4]

1)岐阜大学医学部附属病院 生体支援センター、2)同 薬剤部、3)同 検査部、
4)東海大学医学部基礎医学系生体防御学

【背景】近年、薬剤耐性菌によるアウトブレイクの事例が相次いでおり、感染制御のさらなる充実が求められている。当院では、標準予防策や経路別感染予防策などのスタッフ教育を行うとともに、二次元キャリアマップ(2DCM)などによる薬剤耐性菌検出状況の把握および早期介入を行って来た。さらに、感染制御活動の強化を目的に、2009年8月より薬剤師および医師を中心とした抗菌薬適正使用への取り組み(Antimicrobial Stewardship)を開始した。当院での抗菌薬適正使用の取り組みの評価、および、薬剤耐性菌の検出状況の推移について報告する。
【方法】2008年8月から2012年7月までのデータを収集した。抗菌薬適正使用への取り組みの評価を目的に、介入受け入れ率およびその内容、抗菌薬使用量の推移、抗菌薬長期間投与症例数の推移、抗菌薬投与症例の入院日数の推移を調査した。
薬剤耐性菌の検出状況の指標として、MRSA検出数(新規および総数)の推移および、入院症例での新規MRSA検出率(1,000患者日 (patient day) あたりのMRSA検出数)の推移を調査した。
【結果】対象期間中の抗菌薬適正使用への介入の受け入れ率は94.2%(522件/554件)と高かった。介入の内容別では経験的治療薬の変更、投与量の増量、投与継続あるいは中止の提案、TDMの提案が多かった。2週間以上の抗菌薬使用症例は、取り組み前は抗菌薬使用症例のうち5.2%を占めていたが､取り組み開始3年目には2.3%と有意な低下を認めた($P<0.001$)。抗菌薬投与症例での入院日数の中央値は、取り組み開始前の12日(7-23日)から、取り組み開始3年目には11日(6-19日)に低下を認めた($P<0.0001$)。
一方、MRSA検出数の総数、新規検出数および入院症例での新規MRSA検出率は低値で推移していた。
【考察】当院で取り組んでいる抗菌薬適正使用活動は、薬剤耐性菌選択の低下のみならず長期抗菌薬使用症例の減少や抗菌薬投与症例での入院日数の低下につながったと考えた。
薬剤耐性菌に関しては､活動開始後MRSAの大きなアウトブレイク事例の発生を認めず､MRSAの検出数は低値で推移した。今後さらなる薬剤耐性菌検出数の低下のためには、標準予防策の遵守率等、抗菌薬使用状況以外の要素も含めた一層の感染制御活動が必要と考えた。

JANIS データよりみた CLSI ブレークポイント変更に伴う *P. aeruginosa* および *E. coli* における薬剤感受性率への影響

○堀　光広（岡崎市民病院）、長沢　光章（東北大学病院診療技術部）、
郡　美夫（東京医学技術専門学校）、犬塚　和久（愛知県厚生連医療事業部）、
佐藤　智明（山形大学医学部附属病院）、静野　健一（千葉市立海浜病院）、
柳沢英二（(株)ミロクメディカルラボラトリー）、
荒川　宜親（名古屋大学大学院医学系研究科　分子病原細菌学／耐性菌制御学）

【はじめに】CLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute：米国臨床検査標準委員会）は2008年以降種々の菌種に対して，β-lactam剤のブレイクポイント（BP）の変更を行っている。2010年のM100-S20では腸内細菌属においてセファロスポリン薬であるCEZ, CTX, CTRX, CAZのBPが8μg/mL以下から1μg/mL以下へ，2012年のM100-S22では *P. aeruginosa* にてPIPCのBPが64から16μg/mLへ、IPM, MEPMのBPも4から2μg/mLに引き下げられた。これらのBP変更が，*E. coli* および*P. aeruginosa* の薬剤感受性試験結果に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】JANISへ報告された2009～2011年の各6月～8月のデータを用い旧BPと新BPによる*E. coli* および*P. aeruginosa* の薬剤感受性率について比較検討を行った。

【結果】*E. coli* のCEZ, CTX, CTRX, CAZにおける薬剤感受性率は旧BPと新BPにて比較すると1~3%程度とわずかな低下を認めた。一方，*P. aeruginosa* における各年の薬剤感受性率は，旧BPと新BP でそれぞれPIPCでは87%から76%へ，IPMでは73%から60%へ，MEPMでは79%から64%となり11～15%の低下を認めた。

【考察】薬剤感受性率は BP の変更により変動が認められた。特に，*P. aeruginosa* の PIPC およびカルバペネム剤では約 11～15%と大きな変化を認めた。このことより，BP の変更を行うと過去のデータとの比較などに問題が生じることが示唆された。薬剤感受性率の経年的な変動を調査していく場合，BP の適応に注意を払う必要がある。

集計方法別の薬剤感受性率の比較

〜*P. aeruginosa* の感受性成績〜

○佐藤智明（山形大学病院）、長沢光章（東北大学病院）、郡　美夫（東京医学技術専門学校）

犬塚和久（愛知県厚生連医療事業部）、堀　光広（岡崎市民病院）、静野健一（千葉市立海浜病院）、

柳沢英二（ミロクメディカルラボラトリー）、荒川宜親（名古屋大学医学部）

【はじめに】多くの施設で分離菌の薬剤感受性率を集計し、抗菌薬選択の有用な情報として臨床に活用されている。しかし、その集計方法に明確な規定はなく各施設においてさまざまな方法で集計しているのが現状である。今回、JANIS 提出データを使用し、複数の集計方法（集計対象菌種の選択）による薬剤感受性率の差について比較検討したので報告する。

【対象と方法】2010 年 1 月〜12 月の 1 年間に JANIS 検査部門に提出されたデータのうち、*P. aeruginosa* の感受性成績が報告され、MIC 値から S,I,R の判定が可能であった 126,542 株（外来患者株：25,180 株、入院患者株 101,362 株、施設数：582 施設、患者数：64,319 患者）を集計対象とし、S,I,R への判定は CLSI 2008(M100-S18)に準拠した。集計方法は①全菌株（重複処理なし）、②同月同一患者初回検出株（外来）、③同月同一患者初回検出株（入院）、④対象期間同一患者初回検出株、⑤対象期間同一患者最終検出株、⑥対象期間複数回検出患者初回分離株、⑦対象期間複数回検出患者最終分離株、⑧材料別とし、③〜⑧は入院患者株のみを対象とした。

【結果】集計方法別の薬剤感受性率（%）

集計方法	AZT	PIPC	IPM	MEPM	CAZ	CFPM	AMK	GM	LVFX
①	71.1	88.0	76.1	81.6	84.0	80.0	92.9	80.7	71.4
②	81.5	94.6	90.3	93.6	92.9	89.7	94.3	84.4	79.4
③	72.9	88.8	77.8	83.3	85.8	82.5	93.9	81.8	72.8
④	76.4	90.8	81.6	86.7	88.4	84.8	94.7	83.7	76.3
⑤	73.6	89.3	79.1	84.4	86.3	82.6	94.2	82.9	74.3
⑥	74.1	89.6	78.2	84.0	86.5	82.5	94.1	82.1	73.6
⑦	66.8	85.6	71.9	78.2	81.0	77.0	92.7	80.1	68.5
⑧血液	70.8	89.1	79.9	85.4	84.8	83.3	95.5	87.5	81.0
⑧喀痰	69.1	87.0	83.1	83.9	83.4	78.5	92.4	80.2	71.3
⑧尿	71.5	88.3	72.7	80.2	84.9	80.6	94.4	82.3	71.2
MAX-MIN	14.7	8.9	18.4	15.4	11.9	12.8	3.1	7.4	12.5

【まとめ】JANIS の重複処理に近い同月同一患者初回検出株(③)での薬剤感受性率と重複処理なし(①)の薬剤感受性率に大きな差はなかった。AMK 以外では同一患者複数回検出例の最終検出菌での薬剤感受性率が最も低い結果であった。集計方法による薬剤感受性率は薬剤により異なるが 3.1〜18.4 の差が認められた。抗菌薬選択のエビデンスとして適格な情報とするためには、臨床へ集計方法によって薬剤感受性率が異なることを説明しておくことも必要であり、必要に応じて外来患者検出菌の薬剤感受性率や材料別の薬剤感受性率など詳細な情報を提供することも微生物検査室の役割である。また、他施設との薬剤感受性率の比較を比較する場合は集計条件を統一することが重要である。

日本の同一地域に位置する病院から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の流行調査

○伊藤　歩[1]、中南　秀将[1]、池田　雅司[1]、内海　健太[2]、丸山　弘[3]、坂本　春生[4]、
高里　良男[5]、西成田　進[6]、野口　雅久[1]
[1]東京薬科大学・薬学部・病原微生物学教室、[2]東京医科大学・八王子医療センター・呼吸器内科、[3]日本医科大学・外科、[4]東海大学医学部付属病院・口腔外科、[5]国立病院機構災害医療センター・脳神経外科、[6]公立阿伎留医療センター・感染症科

【目的】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は、病院内だけでなく市中においても流行が確認されている。そのため、MRSA の動向を知るためには、地域全体を調査対象にする必要がある。本研究では、多摩地区に位置する 4 病院と MRSA Infection Control Network を構築し、分離された MRSA の分子疫学的調査を行った。

【材料・方法】菌株は 2009 年に日本の東京都多摩地区に位置する 4 病院から分離された 584 株の MRSA を使用した。各種薬剤感受性は、寒天平板希釈法により測定し、最小発育阻止濃度（MIC）から判定した。毒素遺伝子の検出および SCC*mec* typing は PCR 法により行った。Pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）は、*Sma*I により切断した染色体 DNA を用いて行った。

【結果・考察】薬剤感受性を測定した結果、分離された病院が異なっても MRSA の薬剤感受性パターンは類似していた。SCC*mec* type は、type II が主流であったが、type IV、V の MRSA もわずかながら分離された。毒素遺伝子の検出を行ったところ、*pvl* は 1.0%、*tst* は 62.3%に認められた。さらに、552 株の MRSA について PFGE 解析を行った。その結果、299 PFGE タイプに分類され、4 病院から同一の PFGE タイプを持つ MRSA が分離された。本研究から、病院内で流行する MRSA は、異なる施設であっても、同一地域であれば共通した菌株が存在することが明らかとなった。したがって、同一地域の病院は協力し、地域全体で感染対策に取り組む必要がある。

MRSA POT 解析からみた MRSA の抗菌剤に対する感受性の検討

ー院内感染型と市中感染型ー

○平山 幸雄[1]、村川 智美[1]、吉多 仁子[2]、所　知都子[2]、北橋 由紀子[2]、田澤 友美[2]、松本 智成[1]
（[1]大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部、[2]大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター検査科）

はじめに

化粧品やシャンプーなどの抗菌剤として安息香酸ナトリウムが使用されている。また、ハムやソーセージなどにも抗菌剤として亜硝酸ナトリウムが使用されている。我々は MRSA（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）において、皮膚感染が多いといわれている市中感染型(CA)タイプと院内感染型(HA)タイプではこれらの抗菌剤の効果に差があるのではないかと思い、MRSA POT(Phage Open-reading frame Typing)の遺伝子解析から得た CA タイプと HA タイプについて抗菌剤に対する感受性を比較検討した。

目的

MRSA　POT により分類した HA-MRSA 及び CA-MRSA に関する抗菌剤（安息香酸 Na, 及び亜硝酸Na）の感受性についての比較検討

方法

米国で流行している市中感染型 USA300株を CA のコントロールとした。判定は取扱説明書に従い 当院で分離された臨床分離株 POT1値106を CA、POT1値93、64を HA とした。
CA-MRSA と HA-MRSA について2種類の抗菌剤濃度を変えて co-culture した。37□24時間後、48時間後の CFU で比較検討した。
使用した抗菌剤濃度は、亜硝酸 Na では、40mM, 60mM, 80mM, 100mM とし、安息香酸 Na では20mM, 50mM, 100mM, 200mM とした。

結果

安息香酸 Na 存在下で CA-MRSA 群（USA300, POT1値106）と HA-MRSA 群（POT1値93、64）において24時間後の CFU に差が認められなかった。亜硝酸 Na 存在下で24時間後の CA-MRSA 群では、すべての濃度において CFU の減少が認められなかったが、HA-MRSA 群では、100mM において CFU の減少が認められた。安息香酸 Na　200mM の存在下で48時間後では、CA-MRSA 群で少数の CFU 減少が認められたが、HA-MRSA 群では著しい CFU の減少が認められた。亜硝酸 Na の存在下で48時間後では、CA-MRSA 群において USA300は80mM から CFU の減少が起こり100mM では4コロニーまで減少した。POT1値106では、60mM から CFU の減少が認められ80mM では CFU が認められなかった。一方 HA-MRSA 群では、40mM において数コロニーの CFU を認めたが60mM 以上の濃度では CFU が認められなかった。以上のことから HA-MRSA 群は CA-MRSA 群と比較して一般市中に使われている抗菌剤に対して感受性菌であることが分かった。また、CA-MRSA 群においても亜硝酸 Na に対する感受性に差があることが分かった。

考察

市中で使用されている抗菌剤2剤に対して CA-MRSA 型と HA-MRSA 型では感受性において顕著な差が認められたことから、それぞれの生育環境が大きな要因と考えられる。マスコミ等によく話題になるのは HA-MRSA 型であるが、現実には CA-MRSA 型は小児から成人に至るまで重篤な感染症を起こすケースが多く、HA-MRSA 型よりもむしろ CA-MRSA 型に注意する必要があると思われる。

黄色ブドウ球菌の抗 MRSA 薬の感受性調査

○ 山田景子[1]、白井義憲[1]、金万春[1]、岡本陽[2]、和知野純一[1]、木村幸司[1]、荒川宜親[1]
([1]名大院・医・分子病原細菌学、[2]愛教大・教育・養護教育)

【目的】　黄色ブドウ球菌は、約 3 割の人の皮膚や鼻腔などに見られる常在菌であり、皮膚軟部感染症から重篤な肺炎や敗血症などを引き起こす。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 JANIS の 2011 年の調査では、全検体提出患者数 1,309,993 人のうち 210,382 人から黄色ブドウ球菌 *S. aureus* が検出され（16.1%）、そのうち 114,933 人分がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA であったと報告されている。つまり、*S. aureus* の 54.6%が MRSA であり、依然として分離件数も多く耐性率も高いことがわかる。よって、抗 MRSA 薬は臨床上重要でありこれに対する耐性菌の出現には常に注意を払う必要がある。

【方法】　JANIS には参加していない小規模医療機関を中心に全国から集められた *S. aureus* 臨床分離株 394 株および 2003 年以前に収集された *S. aureus* 臨床分離株 201 株を含む計 595 株について寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC)を測定し、MRSA 感染症治療薬であるバンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、リネゾリド (LZD)、アルベカシン (ABK)の有効性について調査した。さらに、ABK の MIC が比較的高かった株に着目し、その遺伝的な背景を Phage open reading frame typing 法 (POT 法) により調べ ABK の修飾酵素をコードする遺伝子 *aac(6')/aph(2'')* について塩基配列、発現量などを解析した。

【結果】　595 株すべては VCM、TEIC、LZD に対し感性と判定され、耐性を持つ株は見られなかった。0.84%にあたる 5 株が ABK の MIC≧16 (μg/ml)となったが、2003 年以前の株 (2 株/201 株、1.0%)と比較して 2010 年分離株 (3 株/394 株、0.76%)で増加は認められなかった。POT 法の結果では遺伝子型にバリエーションがあった。ABK の MIC が比較的高かった株を中心に PCR を行い *aac(6')/aph(2'')* の存在が 14 株確認された。サザンハイブリから染色体上に存在する可能性が高い菌株が多く見られた。耐性遺伝子の塩基配列を確認したところ、報告されている ABK 高度耐性化に関わる変異は見られなかった。これらの株の MIC は 4-256 μg/ml までばらつきがあり、リアルタイム PCR による発現量は耐性度と相関した。

【考察】　今回調査した 595 株は多くの抗 MRSA 薬に感性と判定された。ABK 耐性株は認められたが年代での変動はなかった。少なくとも同一遺伝子型の菌株の流行は認められなかった。ABK 耐性遺伝子は、プラスミドを介して伝播されるといわれているが、すでにゲノム染色体上に保持されている菌株の方がプラスミドに保持されているとみられる菌株より多かった。今回発見された高度耐性の 1 株は、*aac(6')/aph(2'')* の質的変化がなく、その耐性度の高さについてはさらに解析が必要である。

新しい抗酸菌集菌用試薬 TB-beads 法の検討

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター

○吉多　仁子・所　知都子・北橋　由紀子・田澤　友美・小野原　健一
森下　裕（臨床検査科）、平山　幸雄・松本　智成（臨床研究部）

[目的]抗酸菌検査の塗抹・培養検査や遺伝子検査は、臨床検体の前処理に SAP（セミアルカリプロテアーゼ）-NALC-NaOH 法を用いる。この方法は、主な検体である喀痰の粘液度を SAP で溶解し、NALC- NaOH で汚染除去することで混在する細菌を死滅させ PBS で洗浄後、遠心集菌を行う。抗酸菌の検出にはこのように煩雑な操作で最速で約 70 分という長時間を要する。煩雑な操作のゆえに個人的手技に差があり培養の雑菌率や遺伝子検査の増幅阻害率に影響を及ぼしている。また、洗浄遠心操作に用いる遠心機は高速で冷却機能が必要なため高額であり、多くの施設で抗酸菌検査は外部委託されているのが現状である。

極東製薬工業 K.K より発売された TB-Beads 法は遠心操作が不要で短時間で集菌できる。従来方法と TB-Beads 法を遺伝子検査と培養検査について比較したので報告する。

[原理]TB-Beads 法に用いる磁性ビーズは、ポリマーコーティングされ、検体中に存在する抗酸菌と特異的に結合する。この結合物を磁石で集め洗浄をすることで雑菌を取り除く。Elution Buffer を加え磁性ビーズと抗酸菌を離し、Elution Buffer に PBS 加えを検体として用いた。

[期間・方法]2012 年 7 月～8 月に臨床から提出された喀痰検体を用いた。前処理に SAP-NALC-NaOH と同等な性能を持ち当院のルーチンでの処理である CCE 法を用いた。遺伝子検査は Taq Man 法、TRC 法、LAMP 法、Gene Xpert 法（Cephied 社より治験中）の 4 つの方法を 5 検体で検討した。また、そのうち TRC 法で詳細に比較するため 17 検体を追加し検討した。この合計 22 検体の培養検査はそれぞれ臨床からの依頼があった小川 12 検体と MGIT 10 検体で培養を行った。

[結果]表 1 は 4 つの遺伝子検査の 2 法の結果を記した。表 2 は TRC、表 3 は培養結果の 2 法の結果を記した。表 1 の TB-Beads 法は LAMP 法ですべて陰性になった。その他の結果は一致した。TRC の 2 法は一致率 100%であった。陽性検体の平均時間は CCE 法が 553.3 秒(9.2 分)TB-Beads 法 664.6 秒(11.1 分)(相関係数 0.903)であった。培養検査は一致率が小川培養 83.3%、MGIT 100%で、小川培養のかい離例が 2 検体あった。この 2 検体は CCE 法陽性・TB-Beads 法陰性、コロニ―数は 10 個と 2 個であった。

[考察] TB-Beads 法は遺伝子検査の LAMP 法には用いることはできないが、他の遺伝子検査には用いることが可能であると考えられた。培養検査はほぼ同等と思われるが、特に微量排菌例で今後も検体数を増やし検討する必要があった。TB-Beads 法を用いることで多くの施設で抗酸菌検査が自施設で検査される可能性が高まると考えられた。

表 1)遺伝子検査 4 法の比較

		1	2	3	4	5	
	Graed	P2	P1	M1	P3	P1	
	塗抹	2+	1+	−	1+	−	
	培養	小川 +	MGIT +	−	小川 +	MGIT +	
	同定	TB	M. avium	−	TB	TB	
Taq	CCE	+ 31.3	−	−	+ 44.3	+ 37.1	
Man	Beads	+ 37.8	−	−	+ 41.8	+ 47.0 *	
TRC	CCE	+ 536	−	−	+ 465	+ 1022	
	Beads	+ 817	−	−	+ 512	+ 1731	
LAMP	CCE	+ 8.42	−	−	+ 11.42	+ 12.48	
	Beads	−	−	−	−	−	
Xpert	CCE	+ 13.7	−	−	+ 18.4	+ 25.5	
	Beads	+ 18.6	−	−	+ 21.2	+ 23.7	＊＝検体量不足

Taq Man=Ct
TRC=sec.
LAMP=min.
Gene Xpert=Ct

表　2)TRC 検査の比較

		Beads		
		+	−	
CCE	+	16	0	16
	−	0	6	6
		16	6	22

表 3-1)小川培養の比較 (n=12)

		Beads			
		+	−	雑菌	計
CCE	+	5	2	0	7
	−	0	4	0	4
	雑菌	0	0	1	1
	計	5	6	1	12

表 3-2)MGIT 培養の比較 (n=10)

		Beads			
		+	−	雑菌	計
CCE	+	10	0	0	10
	−	0	0	0	0
	雑菌	0	0	0	0
	計	10	0	0	10

緑膿菌のデジタル分子疫学法の開発

〇鈴木匡弘[1]、山田和弘[1]、細羽恵理子[2]、長尾美紀[3]、馬場尚志[4]、飯沼由嗣[4]
[1]愛知県衛生研究所　細菌研究室、[2]国立病院機構　名古屋医療センター、
[3]京都大学大学院医学研究科　臨床病態検査学、[4]金沢医科大学　臨床感染症学

【目的】緑膿菌は院内感染の原因菌として感染管理が重要な菌である。感染管理手法の一つとしてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）を用いた分子疫学解析があげられるが、時間やコストがかかり日常的に用いることは困難である。そこで、緑膿菌の分子疫学解析を容易とするため、PCR を用いた迅速分子疫学解析法（PCR based ORF typing 法：POT 法）を開発し、性能評価を行った。
【方法】緑膿菌 POT 法ではゲノム中に散在する genomic islet を 10 個、ファージ由来 ORF を 5 個、メタロ－β－ラクタマーゼである IMP と VIM の合計 17 個の ORF 検出パターンから菌株識別することとした。上記 17 個に緑膿菌マーカー2 個を加え、10-plex および 9-plex PCR の 2 反応系列を確立した。ORF の有無を 1,0 に置き換え、genomic islet 部分（POT1）とファージ及びメタロ－β－ラクタマーゼ部分（POT2）に分け 10 進法に変換し、POT 型とした。POT 法を用いて臨床分離株（415 株）の解析を行った。一部の株は multilocus sequence typing (MLST)法および PFGE 法との比較も行った。
【結果及び考察】POT 法を用いて臨床分離株をタイピングした結果 107 遺伝子型に分類できた。このうち集団感染が疑われた事例では 410-8 が 20 株、および 646-8 が 24 株見られた。PFGE クラスターとの比較では 410-8 は 79%のホモロジーを示し、646-8 の集団は 94%のホモロジーを示したが、両者は集団感染とされた集団と等しかった。
　また、141 株について、POT 法と MLST 法で識別試験を行ったところ、94 の POT 型および 82 の ST 型に分類された。ST 型は、eBURST 解析により 6 つの clonal complex(CC)と 59 の singleton にまとめられた。また 49 種の ST 型あるいは CC 型に分類された 108 株については、POT1 値と ST 型あるいは CC 型が 1 対 1 で対応した。26 種の ST 型に分類された 33 株については、POT 型（POT1-POT2）としては、23 種類に分類された。この時の POT1 型については、12 種類に分類され、同一 POT1 値の中に 2 ないし 3 種類異なる ST 型が含まれた。
　本法の菌株識別能力は主に genomic islet 保有パターンに依存している。genomic islet の保有パターンは MLST 解析による clonal complex (CC)型に相当する菌株識別能を発揮すると期待され、本 POT 法の菌株識別能力は主にこれを反映したと考えられた。

「Σ-alert matrix（菌の異常集積警告スコア累積カラーマトリクス）」

〇藤本 修平 [1)]、村上 啓雄 [2)]、荒川 宜親 [3)]、柴山 恵吾 [4)]

1)東海大学医学部基礎医学系生体防御学、2) 岐阜大学医学部附属病院生体支援センター・医学部附属地域医療医学センター、 3)名古屋大学大学院医学系研究科細菌学、4)国立感染症研究所細菌第二部

【背景】菌の施設内拡散は、外因性院内感染症、耐性菌施設内拡散の最初のステップであり、常在細菌叢の耐性菌による置換を介して内因性院内感染症の難治化にも重要な役割を果たす。菌の施設内拡散は、不適切な衛生状態を反映しており、それ自体が院内感染症アウトブレイクの危険因子である。菌の施設内拡散の抑止は抗菌薬による選択圧の適正化とともに院内感染症制御の要である。一方、院内感染症の起因菌の多くは身の回りにいて常に分離される常在菌、環境菌であり、その施設内拡散を発見することは必ずしも容易ではない。私たちはすべての菌種に対して、統計的に有為な菌の集積を見いだすことによって菌の施設内拡散を検出する方法（菌の異常集積の自動検出；Probability-based Microbial Dissemination Alert (P-MDA)）を開発し、さらに、その警告を積算した菌の異常集積警告累積(Σ-alert)によって、その施設の感染対策上の問題点を見いだせることを示した。今回、2 次元表示（棒グラフ）のΣ-alert をカラースケールを用いて 1 次元化することで、全分離菌の数年分の施設内拡散状況を 1 枚の 2 次元表示に置き換えるΣ-alert matrix を開発し、応用について検討した。

【方法】菌の分離が人為的介入無く偶然だけに支配されて発生したという帰無仮説を 2 項分布を用いて否定することで菌の分離に人為的介入があることを統計的に証明し警告を発する P-MDA アルゴリズムを実装した Medlas®-SHIPL（Standardized Hospital Infection Primary Lookout）に、大学病院（614 床）、大研修病院（413 床）、中規模研修病院(259 床)、アウトブレイクを経験した 3 施設（VRE 2 施設、セラチア 1 施設）の 4～7 年分の全細菌検査データを移植し P-MDA を算出した。得られた P-MDA から菌毎に月毎のΣ-alert を算出し、時間を横軸、菌種を縦軸として格子(matrix)化した。Σ-alert の月毎の値をカラーコード（低値（0）より高値（500）を、黒(0)→黄(100)→赤(500)に割り当て）化して格子上に色つきの方形として表現した。

【結果】1 施設の数年分の全ての菌種の施設内拡散を一枚の格子で概観できた。複数施設の比較も一枚の図上で行うことができた。綿密な院内感染管理が行われている施設の matrix は全体が暗く、アウトブレイクを繰り返している施設は全体が明るくなった。感染対策の強化によって菌の施設内拡散が減少する様子が観察できた。綿密な感染対策が行われていた施設で研修医の受け入れ開始後に菌の施設内拡散が増加した様子を観察できた。直近 12 ヶ月のΣ-alert の合計で降順に並べ直すと上位に施設内拡散を繰り返す菌がリストされ、その共通点から、感染対策の問題点を予測することができた。

【考察】Σ-alert matrix によって、数年分の菌の施設内拡散状況を概観することができ、複数の施設の状況についても直感的に把握できると考えた。施設の感染対策の問題点を把握し、実施した感染対策が菌の施設内拡散に与えた影響を知るための有用な方法と考えた。JANIS を軸とした細菌検査データの標準化が進み電子的なデータの収集は日常化している。しかし、適当なデータの処理法を用意しないと、収集した膨大なデータも利用が進まない。一方、感染対策地域連携加算の導入など複数病院で感染対策を支えあう仕組みが作られはじめている。複数病院で感染対策の支援を行うためには、他病院の状態を迅速かつ詳細に把握することが必要であり、Σ-alert matrix などを利用できる仕組みを作ることが重要である。